UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1949-1950 — N° 104

RECHERCHES ANALYTIQUES ET BIOCHIMIQUES SUR LA SALICYLÉMIE

Travail effectué au Laboratoire de Chimie biologique et médicale
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux
(Professeur F. TAYEAU)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le Mercredi 19 Juillet 1950

PAR

Robert NIVET

PHARMACIEN
DIPLÔMÉ DE MÉDECINE COLONIALE
BREVETÉ DE LA MARINE MARCHANDE
DIPLÔMÉ DE MÉDECINE DU TRAVAIL

Né à Barbezieux (Charente), le 19 Octobre 1919

Examinateurs de la Thèse

MM. TAYEAU, professeur	*Président*
CHELLE, professeur	*Juges*
SIGALAS, professeur	
SARIC, agrégé	

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1950

NIVET (Robert)

Recherches analytiques et biochimiques sur la salicylémie. Travail effectué au Laboratoire de chimie biologique et médicale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux (Professeur F. TAYEAU). — Bordeaux, impr. E. Drouillard, 1950. In-8°. VII-87 p., fig.

(Thèse Médec. Bordeaux. 1949-1950. N° 104.)

NIVET (Robert)

Recherches analytiques et biochimiques sur la salicylémie. Travail effectué au Laboratoire de chimie biologique et médicale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux (Professeur F. TAYEAU). — Bordeaux, impr. E. Drouillard, 1950. In-8°. VII-87 p., fig.

(Thèse Médec. Bordeaux. 1949-1950. N° 104.)

NIVET (Robert)

Recherches analytiques et biochimiques sur la salicylémie. Travail effectué au Laboratoire de chimie biologique et médicale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux (Professeur F. TAYEAU). — Bordeaux, impr. E. Drouillard, 1950. In-8°. VII-87 p., fig.

(Thèse Médec. Bordeaux. 1949-1950. N° 104.)

NIVET (Robert)

Recherches analytiques et biochimiques sur la salicylémie. Travail effectué au Laboratoire de chimie biologique et médicale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux (Professeur F. TAYEAU). — Bordeaux, impr. E. Drouillard, 1950. In-8°. VII-87 p., fig.

(Thèse Médec. Bordeaux. 1949-1950. N° 104.)

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1949-1950 — N° 104

RECHERCHES ANALYTIQUES ET BIOCHIMIQUES SUR LA SALICYLÉMIE

Travail effectué au Laboratoire de Chimie biologique et médicale
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux
(Professeur F. TAYEAU)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le Mercredi 19 Juillet 1950

PAR

Robert NIVET

PHARMACIEN
DIPLÔMÉ DE MÉDECINE COLONIALE
BREVETÉ DE LA MARINE MARCHANDE
DIPLÔMÉ DE MÉDECINE DU TRAVAIL

Né à Barbezieux (Charente), le 19 Octobre 1919

Examinateurs de la Thèse :

MM. TAYEAU, professeur ..... *Président*
CHELLE, professeur .....
SIGALAS, professeur ..... *Juges*
SARIC, agrégé .....

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1950

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN HONORAIRE : M. DUPÉRIÉ.
DOYEN : M. PORTMANN. — **ASSESSEUR** : M. CHELLE.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. DENIGÈS, A. MANDOUL, PETGES, GUYOT, ANDÉRODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, PéRY, LABAT, CHARRIER, DUBREUIL, MACHEBŒUF.

PROFESSEURS :

	MM.
Clinique médicale	DUPÉRIÉ, CREYX
Clinique chirurgicale	PAPIN, MASSÉ
Clinique d'accouchements	RIVIERE
Clinique gynécologique	MAGENDIE
Anatomie pathologique et microscopie clinique	DE GRAILLY
Anatomie	VILLEMIN
Anatomie générale et histologie	MAYER
Hygiène et Clinique de la tuberculose	PIECHAUD
Médecine légale et médecine du travail	DERVILLÉE
Electroradiologie et clinique d'électricité médicale	REBOUL
Chimie	CHELLE
Matière médicale	GOLSE
Pharmacie	VITTE
Physiologie	FABRE
Clinique médicale des maladies des enfants	FONTAN
Zoologie et parasitologie	SIGALAS

	MM.
Médecine expérimentale	AUBERTIN
Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	LOUBAT
Clinique des maladies infectieuses	DAMADE
Chimie biologique et médicale	N...
Physique médicale et pharmaceutique	PIFFAULT
Médecine coloniale et Clinique des maladies exotiques	BONNIN
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JOULIA
Clinique des maladies des voies urinaires	DARGET
Clinique des maladies nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN
Toxicologie et hygiène appliquée	CASTAGNOU
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ
Botanique et cryptogamie	GIRARD
Thérapeutique	BROUSTET

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. PERRENS (Maladies mentales), DUFOUR (Anatomie), MESNARD (Pharmacie), TAYEAU (Chimie biologique).

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

	MM.
Parasitologie	PAUTRIZEL
Physiologie	Mlle ROUGIER
Bactériologie	MOUSTARDIER

	MM.
Pharmacie (1re Section)	R. GOLSE
Pharmacie (2e Section)	MASQUELIER
Pharmacie (3e Section)	CAZAUX

MAITRE DE CONFÉRENCES :

Physique pharmaceutique ..... M. BLANQUET.

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.
Médecine générale	SARIC, DUBARRY, F.-J.TRAISSAC, BERGOUIGNAN, LÉVY
Chirurgie générale	POUYANNE, LAUMONIER, CHAVANNAZ
Chimie biologique	N...
Obstétrique	MAHON, CHASTRUSSE

	MM
Ophtalmologie	BESSIÈRE
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS
Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT
Histologie	N...
Pédiatrie et puériculture	VERGER
Médecine légale et médecine du travail	L'ÉPÉE
Electro-radiologie	LACHAPÈLE
Odonto-stomatologie	MARONNEAUD
Urologie	LANGE

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Médecine opératoire	DUFOUR
Accouchements	MAHON
Puériculture	N...
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI, COUSTOU
Anatomie	RIGAUD
Chimie minérale	BARIN
Cryptogamie	LAUBIE

	MM.
Pharmacie galénique	MESNARD
Organographie et physiologie végétale	TEMPÈRE
Chimie biologique	NEUZIL
Pathologie chirurgicale	LAUMONIER, VILLAR
Zoologie pharmaceutique	BAILENGER
Hydrologie pharmaceutique	CAZAUX

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MA FEMME

A MON FILS

A LA MÉMOIRE DE MA SŒUR

A MON PÈRE

A MA MÈRE

A MES BEAUX-PARENTS

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A MON AMI JACQUES PAROT

A MES CAMARADES DU LABORATOIRE
DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE BORDEAUX

A NOS MAITRES DES HOPITAUX

A NOS MAITRES DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

A MONSIEUR LE PROFESSEUR CREYX

PROFESSEUR DE CLINIQUE MÉDICALE
MÉDECIN DES HÔPITAUX
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
CROIX DE GUERRE
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Très respectueux hommage.

A NOS JUGES :

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ R. SARIC

MÉDECIN DES HÔPITAUX

Qui a bien voulu nous faire l'honneur de siéger dans notre Jury de thèse.

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. SIGALAS

PROFESSEUR DE ZOOLOGIE ET PARASITOLOGIE

DIRECTEUR HONORAIRE DE LA STATION BIOLOGIQUE D'ARCACHON

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

CROIX DE GUERRE

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Vous avez été le premier de nos Maîtres et nous n'oublierons jamais les encouragements que vous nous avez prodigués au cours de nos peines.

MONSIEUR LE PROFESSEUR CHELLE

PROFESSEUR DE CHIMIE

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

CHEVALIER DE L'ORDRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE

En remerciement de la profonde sympathie qu'il nous a toujours, et en toutes circonstances, manifestée.

A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR F. TAYEAU

CHARGÉ DE LA CHAIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE

DOCTEUR ÈS SCIENCES

J'ai la grande joie et le grand honneur de vous avoir comme Président de thèse.

Veuillez trouver ici le témoignage de ma plus profonde reconnaissance pour toute la peine que vous vous êtes donnée et le soutien que vous m'avez accordé au cours des nombreux mois passés dans votre laboratoire; jamais, en effet, vous ne m'avez ménagé vos encouragements, vos conseils affectueux malgré les lourdes charges qui vous incombent.

Veuillez accepter, Monsieur le Professeur, mes plus sincères remerciements.

RECHERCHES ANALYTIQUES ET BIOCHIMIQUES SUR LA SALICYLÉMIE

INTRODUCTION

Les perfectionnements apportés aux techniques de dosages biologiques ne sont pas étrangers aux progrès de la thérapeutique. L'ère des traitements empiriques s'estompe peu à peu pour faire place à des thérapeutiques rationnelles souvent aiguillées par les examens biologiques.

La sensibilité variée des individus à un médicament donné dépend de divers facteurs, parmi lesquels les vitesses d'absorption et d'élimination du médicament jouent un rôle considérable. Aussi, s'efforce-t-on aujourd'hui, chaque fois que cela s'avère possible, de guider la posologie de certains médicaments par le taux qu'ils atteignent dans le sang : c'est ainsi, par exemple, que les services hospitaliers, appliquant le traitement à la streptomycine, suivent régulièrement le taux de cet antibiotique dans le sang et veillent à ce que ce taux ne descende pas en dessous de la concentration efficace.

Cette notion acquiert une importance toute particulière lorsque, pour manifester une efficacité appréciable, le médicament utilisé doit atteindre un taux sanguin élevé, voisin de la concentration susceptible d'entraîner à coup sûr des symptômes d'intolérance. Il en est ainsi pour le salicylate de sodium qui, dans certaines affections comme le rhumatisme articulaire aigu, par exemple, doit être prescrit à

forte dose. Il importe donc de pouvoir déterminer dans ce cas le taux de la salicylémie.

En France, la salicylémie est assez rarement déterminée; il suffit de parcourir la thèse de JUIN [36], par exemple, pour se rendre compte que, dans la grande majorité des cas diagnostiqués intoxication salicylée, la détermination de la salicylémie n'a même pas été effectuée; on voit même presque toujours le clinicien faire appel au laboratoire pour des examens variés (réserve alcaline, chlore sanguin, glycémie, azotémie, *p*H urinaire, albuminurie, hématurie, corps cétoniques, etc.), alors que la teneur du sérum en salicylate pourrait être pour lui une première indication importante. Il faut reconnaître, il est vrai, que les nombreuses méthodes proposées pour le dosage ne donnent pas toujours des résultats bien constants. Ceci tient, à notre avis, d'une part, à la qualité insuffisante de la méthode employée, d'autre part, à une concentration sérique en perpétuel remaniement. La salicylémie dépend, en effet, de la quantité administrée, du mode d'administration du médicament, de son élimination urinaire et du comportement du sujet : une même dose donnée à deux malades différents ne se traduit pas chez l'un et l'autre par une salicylémie à peu de chose près identique.

Aux Etats-Unis, la salicylémie est déterminée depuis plusieurs années déjà : chez tous les individus traités au salicylate, on suit systématiquement la concentration sanguine de ce médicament et certains auteurs, tel COBURN [11], ont particulièrement insisté sur la nécessité et l'intérêt de déterminer cette salicylémie.

Cette constatation avait frappé notre Maître, M. le Professeur TAYEAU, qui a bien voulu nous proposer d'étudier en détail les principales techniques de dosage du salicylate dans le sang. Nous avons profité de cette étude pour examiner en même temps les intéressantes modifications apportées au système lipidoprotéique du sérum par le salicylate.

Si les quelques résultats que nous apportons dans cette thèse pouvaient rendre service aux laboratoires de biologie clinique, l'effort que nous avons fourni serait très largement récompensé.

Nous ne voudrions pas aborder le détail de notre étude sans adresser nos plus vifs remerciements aux divers services des hôpitaux de Bordeaux qui ont bien voulu mettre à notre disposition des échantillons de sang de malades traités par le salicylate de sodium.

PREMIÈRE PARTIE

PRINCIPALES MÉTHODES DE DOSAGE DU SALICYLATE DE SODIUM DANS LE SÉRUM SANGUIN

Dans cette première partie, nous nous proposons d'examiner rapidement les différentes méthodes permettant de doser l'acide salicylique, ses sels ou ses dérivés. Nous insisterons quelque peu sur deux d'entre elles qui nous ont rendu les plus grands services au cours de nos recherches : les méthodes de GALIMARD [20] et de BRODIE, UDENFRIED et COBURN [5]. Les publications se sont montrées particulièrement abondantes sur ce sujet; pour s'en rendre compte, le lecteur pourra consulter l'ouvrage si complet de GROSS et GREENBERG [26] qui mentionne quelque deux cents références bibliographiques ayant trait à la caractérisation et au dosage des salicylates ou de l'acide salicylique et de ses dérivés. Volontairement, nous avons limité notre étude aux principes généraux auxquels viennent se greffer les diverses méthodes.

En fait, on peut diviser en deux grandes classes les différentes méthodes : les méthodes chimiques et les méthodes physiques. Les méthodes chimiques restent de très loin les plus utilisées; elles peuvent se subdiviser à leur tour en techniques pondérales, volumétriques et colorimétriques, et ces dernières en méthodes par extraction et méthodes à lecture directe. Quant aux secondes, elles ont été jusqu'à maintenant beaucoup moins employées et leur mise en valeur demeure plus récente.

CHAPITRE PREMIER

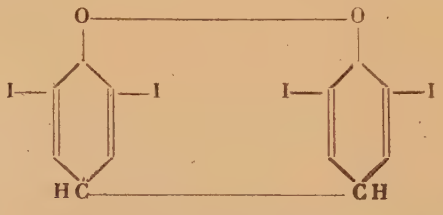
Méthodes chimiques : techniques pondérales.

Ces techniques doivent être rattachées à la découverte par LAUTEMANN [37] d'un corps iodé rouge, connu plus tard sous le nom de *rouge de Lautemann* et obtenu par action des alcalis sur le phénol tri-iodé :

$$C_6H_2I_3OH + KOH \rightarrow C_6H_2I_2O + IK + H_2O$$

(rouge de LAUTEMANN)

Le « di-iodo-phénylène oxyde » formé (rouge de LAUTEMANN) se présente sous la forme d'un produit rouge amorphe, insoluble dans l'eau, insoluble dans les solvants organiques sauf dans le sulfure de carbone; il est inattaqué à la température ordinaire par les acides et les alcalis. Selon BENZINGER et KAMMERER [2], il répondrait à la constitution suivante :



La réaction a été tout d'abord mise en jeu pour doser le phénol puis, plus tard, pour l'acide salicylique (MESSINGER et VORTMANN [47, 48]); ces auteurs déclaraient obtenir un « éther hypoiodeux d'un phénol di-iodé » dans le premier cas, et un « sel de potassium d'un éther hypoiodeux d'acide salicylique mono-iodé » dans le second cas.

Bougault [3] s'est intéressé à cette réaction : après avoir montré que les composés décrits par Messinger et Vortmann n'étaient que des mélanges, il réussit à expliquer le mécanisme de formation du rouge de Lautemann :

Dans un premier temps, l'iode, après s'être fixé sur le phénol, oxyde le 2-4-6 tri-iodo-phénol formé et conduit à une quinone triiodée; celle-ci perd un atome d'iode et les restes de deux molécules se soudent par leurs atomes de carbone devenus libres, l'iode s'éliminant sous forme de deux molécules d'iodure de potassium. Dans le cas de l'acide salicylique, il se produit, en outre, une élimination d'anhydride carbonique aux dépens du groupement carboxyle de l'acide salicylique.

Il en tira ensuite une méthode de dosage qui permet de doser l'acide salicylique même en présence d'acide cinnamique.

Ce procédé de dosage a fait l'objet de quelques modifications (Emery [15], François et M^lle Séguin [19], Frédéric [20]). Dans tous les cas, le précipité de rouge de Lautemann formé est recueilli, lavé, desséché et pesé. Le poids obtenu multiplié par 0,4012 (selon Bougault) ou 0,4014 (selon Frédéric) correspond à la quantité d'acide salicylique de la prise d'essai.

Ces diverses techniques nécessitent malheureusement une prise d'essai assez importante. Pour remédier à cet inconvénient, des méthodes volumétriques ont été proposées.

CHAPITRE II

Méthodes chimiques : techniques volumétriques.

Les techniques permettant de doser l'acide salicylique par volumétrie sont toutes basées sur la transformation de ce corps en dérivé trihalogéné du phénol :

$$C_6H_4\begin{matrix}OH\\COOH\end{matrix} + 6\ Br = 3\ BrH + CO_2 + C_6H_2Br_3OH$$

ce dernier apparaît sous la forme d'un précipité blanc-jaunâtre.

Certains auteurs titrent alors la quantité d'halogène qui n'a pas réagi, d'autres mesurent la quantité d'anhydride carbonique dégagé.

Technique de Messinger et Vortmann [47]

Ces auteurs ont fixé, les premiers, le protocole expérimental du dosage : ils traitent à chaud, au bain-marie à 60°, une solution de phénol et une quantité connue et en excès d'iode décinormale; après refroidissement, ils acidifient (acide sulfurique dilué), ils ajoutent un excès d'eau et, après filtration, ils prélèvent une partie aliquote sur laquelle ils titrent l'iode en excès. Un calcul simple leur permet de déterminer l'iode fixé et ainsi la quantité d'acide salicylique (*).

(*) Les phénols et l'acide salicylique en particulier absorbent ainsi six atomes d'iode par molécule.

Bougault considère que les résultats de cette méthode sont utilisables, mais quelquefois un peu trop élevés.

Technique de A. Taub et H. Taub [57]

A. et H. Taub emploient le brome à la place de l'iode et utilisent ensuite la propriété du brome de déplacer l'iode, pour doser enfin ce dernier halogène libéré par l'hyposulfite de sodium.

Technique de Bradley [4]

Bradley traite également l'acide salicylique par le brome, mais il effectue sa détermination par le dosage de l'anhydride carbonique.

Cette méthode lui permet ainsi le dosage de l'acide salicylique ou même acétyl-salicylique et de leurs sels.

CHAPITRE III

Méthodes chimiques : techniques colorimétriques.

La majeure partie des techniques colorimétriques permettant le dosage de l'acide salicylique mettent en jeu la coloration violette obtenue par addition d'un sel de fer III à une solution aqueuse contenant l'acide à doser.

La réaction est la suivante :

$$3\,C_6H_4{<}^{COOH}_{OH} + Cl_3Fe = 3\,ClH + (C_6H_4{<}^{COO}_{OH})_3\,Fe$$

Les sels de fer utilisés peuvent être le perchlorure de fer, l'alun de fer ou le nitrate ferrique.

Il existe cependant une technique ne mettant pas en jeu les sels de fer et qui a permis d'obtenir de fort intéressants résultats; cette technique est celle de Denigès [14] que nous exposerons tout d'abord.

A. — MÉTHODES PAR EXTRACTION

Technique de Denigès [14]

La technique employée par Denigès utilise la propriété que possède le méthylglyoxal de donner une coloration rouge ou rosée, suivant la concentration, avec une solution alcoolique d'acide salicylique.

Après extraction de l'acide salicylique à l'aide d'éther, de benzène ou d'éther de pétrole, on évapore le solvant à siccité

et on reprend le résidu par l'alcool. A la solution ainsi obtenue, on ajoute le réactif au méthylglyoxal, une trace de brome et de l'acide sulfurique pur. Le mélange est porté dans l'eau bouillante pendant deux minutes. Il apparaît alors, dans ces conditions, une coloration pouvant varier du rose au rouge, que l'on compare avec un témoin traité de la même façon. On peut ainsi doser l'acide salicylique, les salicylates d'amyle, éthyle, méthyle, etc.

Technique de Frederichsen [21]

Frederichsen a décrit une technique dans laquelle il a précisé certains points de détails importants pour la précision du dosage et applicables à de nombreuses méthodes; aussi, nous ne croyons pas superflu de les rappeler.

Le principe de sa méthode consiste à extraire l'acide salicylique et à le doser par colorimétrie à l'aide d'alun de fer.

Frederichsen étale sur un papier filtre taré une petite quantité de sang. Le papier ainsi traité est placé dans une solution chlorhydrique de chlorure de potassium. La solution est portée à l'ébullition pendant trois heures. Le papier et la solution sont recueillis sur un entonnoir à filtration, lavés puis traités à plusieurs reprises par l'éther. Ce solvant extrait ainsi l'acide salicylique. Ce mode opératoire permet d'éviter les émulsions qui se produisent généralement lorsque l'on agite le sérum avec le solvant organique.

La solution éthérée est évaporée au bain-marie à une température inférieure de 1 à 2° à celle correspondant au point d'ébullition de l'éther. Ainsi, on évite les projections. Les dernières traces d'éther sont chassées par un courant d'air, condition nécessaire pour éviter les pertes d'acide salicylique. Le résidu est dissous dans l'eau chaude et la solution traitée par le sel ferrique présente une coloration violette dont l'intensité est comparée avec des témoins préparés à l'avance.

Technique de Herissey [28]

Cette méthode met en jeu l'extraction de l'acide salicylique à l'aide d'éther, puis la réaction colorée au perchlorure de fer.

L'auteur laisse évaporer son éther à température ordinaire, réduisant ainsi au minimum les pertes de substances.

Technique de Galimard [22]

Première méthode :

A la suite de remarques d'ordre technique sur la méthode de Schlesser [55] permettant le dosage de l'acide salicylique dans l'urine, Galimard estima que, pour obtenir une libération totale de l'ion salicylique, il s'avérait nécessaire de soumettre le sérum à un double traitement, acide et alcalin.

L'auteur dilue donc du sérum et le traite d'abord à l'ébullition avec de l'acide chlorhydrique; il effectue ensuite un traitement à la soude. Après neutralisation, il filtre et traite le filtrat par le perchlorure de fer. Il obtient une coloration violette qu'il compare avec un étalon.

Deuxième méthode : microdosage.

A la suite de ses recherches ayant mis en évidence la fixation de l'acide salicylique sur les protéines sériques, Galimard propose une deuxième technique dans laquelle il effectue une extraction à l'alcool bouillant, afin de décoller des protéines tout le salicylate sérique.

En raison des expériences que nous avons effectuées avec cette méthode, nous croyons utile d'en donner en détail le mode opératoire :

On verse 1 cm^3 de sérum dans 10 cm^3 d'alcool à 95°, le tout étant placé dans un tube à centrifuger; on laisse cinq minutes au bain-marie bouillant, on refroidit et l'on com-

pense grossièrement la quantité d'alcool évaporée lors de l'ébullition. On centrifuge ensuite à grande vitesse. On lave le précipité avec de l'alcool à 95° et l'on évapore tous les alcools dans une capsule de porcelaine au bain-marie.

Après évaporation, on reprend le résidu par 10 cm³ d'eau distillée; on obtient alors un liquide trouble contenant en dissolution le salicylate, et en suspension les lipides sériques. On laisse reposer vingt-quatre heures, ce qui permet l'élimination d'une importante fraction des lipides. On filtre, et on obtient ainsi un liquide opalescent que l'on porte à l'électrophotomètre de Meunier préalablement réglé sur écran vert.

Il importe de faire un témoin (B) en raison de l'opacité de la solution. On ajoute alors II gouttes de réactif au perchlorure de fer : on lit la nouvelle graduation sur le tambour (T) de l'électrophotomètre, d'où l'on déduit l'opacité du témoin (B) puis celle provoquée par II gouttes de réactif ajoutées à un sérum normal traité de la même façon (ce chiffre se montre constant, d'après les déterminations de l'auteur, sur un grand nombre de sérums; ce chiffre est de 6). Le nombre trouvé, diminué de celui de la coloration de base et multiplié par 3,2, donne, en milligrammes par litre, la teneur du sérum en salicylate.

$$S = (T - 6 - B) \times 3{,}2 \ (*)$$

Technique de Brodie, Udenfried et Coburn [5]

Ces auteurs ont mis au point une technique de dosage consistant à extraire l'acide salicylique, libéré du sérum par un acide fort, avec le dichloréthylène. Après passage en phase aqueuse, l'acide salicylique est dosé colorimétriquement avec le nitrate ferrique. La lecture est faite au photomètre.

(*) Composition du réactif employé :

Perchlorure de fer, solution officinale	2 cm³
Acide chlorhydrique à 50 p. 100	I goutte
Eau distillée q. s. ad.	100 cm³

Ayant très souvent mis en jeu cette méthode, nous en exposerons le mode opératoire :

Dans un flacon d'environ 60 cm^3, on place 2 cm^3 de plasma, ou bien 1 cm^3 de plasma et 1 cm^3 d'eau, on ajoute 0,5 cm^3 d'une solution d'acide chlorhydrique 6 N. Après cinq minutes environ, on ajoute 30 cm^3 de dichloréthylène. On agite et on transvase le mélange dans un tube à centrifuger d'une contenance de 35 cm^3; on centrifuge à vitesse modérée pendant cinq minutes, on décante la couche aqueuse supérieure par aspiration et on l'élimine (*). On prélève 20 cm^3 de la phase dichloréthylène que l'on place dans un flacon sec bouchant à l'émeri. On ajoute 10 cm^3 d'eau et 0,25 cm^3 de réactif ferrique (**) ; on agite pendant cinq minutes; la phase aqueuse surnageante présente une coloration violette que l'on mesure à l'aide d'un photomètre réglé sur écran vert (filtre 5.400 A). On a établi préalablement une courbe étalon en utilisant des concentrations connues d'acide salicylique en solution aqueuse et en opérant dans les mêmes conditions que précédemment.

Technique de Lester, Lolli et Greenberg [38]

Ces auteurs ont modifié la méthode précédente en employant un plus grand volume de plasma, et en faisant varier les quantités des divers réactifs en vue d'augmenter la sensibilité.

Cette technique exige malheureusement un volume assez important de plasma : 8 cm^3.

B. — MÉTHODES DIRECTES

Les méthodes directes employées par quelques auteurs s'appuient, elles aussi, sur la coloration violette produite

---

(*) Le coefficient de partage entre l'acide salicylique, le dichloréthylène et l'eau acidifiée est tel qu'à la température ordinaire, 90 p. 100 de l'acide salicylique passe dans le dichloréthylène.

(**) Formule du réactif :

Solution de nitrate ferrique à 1 p. 100
dans une solution d'acide azotique 0,07 N.

par l'addition d'un sel ferrique au milieu contenant l'acide salicylique. Ces méthodes trouvent leur originalité dans le fait qu'elles ne demandent pas l'extraction du produit à doser : l'opérateur se contente simplement de diluer la prise d'essai et d'acidifier la solution.

Technique de Keller

Dans la cuve d'un colorimètre ou d'un photomètre approprié, on place une solution de nitrate ferrique (*) et le sérum dilué. Il apparaît une coloration violette dont on mesure l'intensité. Dans ces conditions, on retrouve à peu près 100 p. 100 du salicylate présent dans le milieu.

Technique de Pellegrini et Rabaglia [49]

Cette technique est extrêmement voisine de la précédente : les auteurs utilisent simplement le perchlorure de fer au lieu du nitrate ferrique.

Technique de Mendioroz [46]

Cette méthode se montre également très voisine de la précédente; l'auteur insiste simplement sur la dose d'acide à ajouter, qui joue un rôle important dans l'intensité de la coloration obtenue.

(*) Réactif préparé en employant du nitrate ferrique à neuf molécules d'eau dans une solution d'acide azotique 0,07 N à une concentration de 1 p. 100.

CHAPITRE IV

Méthodes physiques.

Le principe de ces méthodes, appliqué au dosage ou à la recherche de l'acide salicylique et de ses sels, est basé sur la fluorescence produite en lumière ultra-violette par les milieux contenant ces corps en solution. Jusqu'à ces dernières années, les différents auteurs se sont peu préoccupés de ce phénomène. Ce n'est qu'en 1926 que Carnot et Coquoin ont essayé de le mettre en application.

Technique de Carnot et Coquoin [6]

La source de lumière ultra-violette mise en jeu est constituée par un arc à vapeur de mercure dont on élimine les radiations visibles : on utilise dans ce but un écran constitué par une feuille de gélatine imprégnée d'argent réduit. Les auteurs préfèrent utiliser ce métal à l'oxyde de nickel plus fréquemment employé, car l'opacité obtenue est plus efficace vis-à-vis des radiations visibles. Pour éliminer les erreurs dues à la fluorescence des tissus, on examine parallèlement un témoin non salicylé.

Technique de Saltzmann [53]

Dans cette technique, on sépare quantitativement le salicylate des protéines à l'aide d'un réactif à l'acide tungstique. On ajoute au milieu une base forte pour accroître la fluo-

rescence. La fluorescence-témoin du plasma est considérée comme négligeable; on examine donc directement au fluorophotomètre avec le même filtre que celui habituellement employé pour le dosage fluorimétrique de l'aneurine.

Quelques essais sur ces différents types de techniques nous ont très rapidement convaincu des avantages présentés par les méthodes colorimétriques.

Nous nous sommes donc appesanti sur ces méthodes et, avant d'aborder nos expériences biologiques, nous avons effectué un certain nombre d'essais ayant pour but de préciser les conditions optima requises pour effectuer les dosages avec des erreurs minima.

CHAPITRE V

Recherches personnelles.

Etude expérimentale de la réaction colorimétrique ion salicylique - sel ferrique.

Au cours de nos lectures sur les techniques de dosage colorimétrique de l'acide salicylique, nous n'avons trouvé aucune étude sur les différents facteurs susceptibles d'influencer la réaction colorée mise en jeu.

Une telle étude nous a paru utile et nous l'avons entreprise.

Nous nous sommes donc proposé, dans ce chapitre, d'examiner en détail l'influence éventuelle exercée sur la réaction par les facteurs suivants : quantité de réactif mis en œuvre, temps de contact des réactifs, concentration et *p*H.

Nous avons opéré sur des solutions de salicylate de sodium dans l'eau distillée pure et utilisé la formule de réactif ferrique que GALIMARD [24] décrit dans sa méthode de microdosage (*).

(*) Formule du réactif :

Solution officinale de perchlorure de fer	2 cm³
Acide chlorhydrique à 50 p. 100	1 goutte
Eau distillée q. s.	100 cm³

Pour la lecture de l'intensité de la coloration obtenue, nous nous sommes servi de l'électrophotomètre de MEUNIER muni de l'écran vert de 5.700 A.

A. — INFLUENCE DE LA QUANTITÉ DE RÉACTIF FERRIQUE MIS EN JEU SUR L'INTENSITÉ DE LA COLORATION.

Pour cette étude, nous avons préparé deux séries de dix tubes contenant chacun 10 cm³ d'une solution de salicylate de sodium à la concentration de 80 γ par cm³ pour la série A, et 50 γ par cm³ pour la série B. Nous avons alors ajouté aux divers échantillons des quantités croissantes du réactif de GALIMARD, et partout nous avons complété avec de l'eau distillée à un même volume. Après quinze minutes de contact, nous avons effectué des lectures électrophotométriques.

Voici les mélanges que nous avons effectués et les résultats obtenus (tableau I).

TABLEAU I

CONCENTRATION : 50 γ		CONCENTRATION : 80 γ	
Réactif (en gouttes) ajouté à chaque échantillon	Chiffres lus au tambour de l'électrophotomètre de MEUNIER (*)	Réactif (en gouttes) ajouté à chaque échantillon	Chiffres lus au tambour de l'électrophotomètre de MEUNIER
0	0	0	0
I	83	I	135
II	151	II	262
III	153	III	265
IV	153	IV	265
V	153	V	265
VI	151	VI	264
VII	150	VII	261
VIII	149	VIII	258
IX	148	IX	257
X	147	X	255

(*) Les chiffres mentionnés dans tous nos tableaux correspondent à la différence entre le chiffre lu et la valeur du témoin.

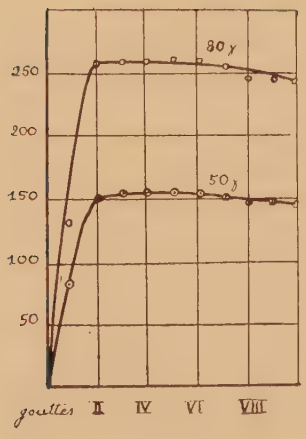


FIG. 1.

Courbes représentatives des variations de l'intensité de la coloration (unités MEUNIER) en fonction de la quantité de réactif mise en jeu.

Au tableau I correspondent les courbes de la figure 1. Le tableau et les courbes montrent qu'il faut mettre en jeu une quantité minimum de réactif pour obtenir une coloration minimum.

B. — INFLUENCE DU TEMPS DE CONTACT ENTRE LES DIVERS RÉACTIFS.

Nous avons effectué cette étude en mettant en jeu trois concentrations différentes en salicylate de sodium.

$$c_1 = 20\,\gamma \text{ par cm}^3$$
$$c_2 = 50\,\gamma \text{ par cm}^3$$
$$c_3 = 80\,\gamma \text{ par cm}^3$$

Chacune de nos trois séries d'expériences a été effectuée de la façon suivante : dans la cuve de l'électrophotomètre de contenance 6 cm³, nous avons placé 5 cm³ de la solution salicylée et IV gouttes du réactif ferrique. Nous avons mélangé et nous avons mesuré l'intensité de la coloration après des temps variables échelonnés entre zéro et trente minutes.

Dans le tableau II se trouvent consignés les résultats que nous avons obtenus.

TABLEAU II

Temps (en minutes)	Unités Meunier		
	Concentration : 20 γ par cm³	Concentration : 50 γ par cm³	Concentration : 80 γ par cm³
0	58	160	252
1	58	160	252
2	58	160	252
3	58	160	252
4	58	160	252
5	58	160	252
6	58	160	252
7	58	158	251
8	58	158	250
9	58	158	250
10	58	158	250
11	58	158	250
12	58	158	250
13	58	158	249
14	58	158	248
15	58	158	248
16	58	158	248
17	56	158	248
18	56	158	248
19	56	158	248
20	56	158	248
21	56	158	248
22	56	158	247
23	55	158	247
24	55	158	247
25	55	157	247
26	55	157	247
27	55	157	247
28	55	157	247
29	55	157	247
30	55	157	247

L'examen des résultats et des courbes montre que le facteur temps de contact entre les divers éléments a très peu d'importance. Signalons que l'on obtient un résultat différent lorsqu'on opère sur un sérum salicylé au lieu d'une solution pure de salicylate de sodium. Dans ce cas, le facteur temps joue un rôle non négligeable, ce qui justifie l'emploi des méthodes de dosage colorimétrique par extraction. Au tableau II correspondent les courbes de la figure 2.

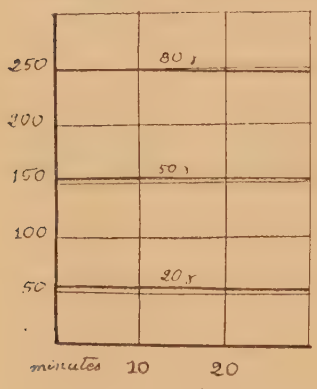


FIG. 2.

Courbes représentatives des variations de l'intensité de la coloration (unités MEUNIER) en fonction du temps de contact entre les divers réactifs.

C. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SALICYLATE DE SODIUM SUR L'INTENSITÉ DE LA COLORATION.

Pour étudier ce facteur important, nous avons effectué deux séries de recherches. Nous avons tout d'abord essayé de déterminer approximativement la zone dans laquelle les variations de densité optique étaient maxima. Pour cela, nous avons préparé dix échantillons de solution de salicylate de sodium contenant des quantités croissantes de ce sel. A chaque échantillon, nous avons ajouté un même volume de réactif et nous avons effectué nos lectures photométriques.

Nos résultats (tableau III) nous ont permis de tracer la courbe de la figure 3. Cette courbe montre que les variations les plus nettes de l'intensité de la coloration correspondent à des concentrations de salicylate de sodium comprises entre 10 et 100 γ par cm^3.

Voulant préciser cette première série de résultats, nous avons effectué une deuxième expérience en mettant en jeu

des concentrations comprises entre 10 et 100 γ par cm³.

Dans le tableau IV se trouvent réunis nos résultats auxquels correspond la courbe de la figure 4.

Nos résultats montrent nettement que si, utilisant les doses de réactif décrites, on veut effectuer avec une précision satisfaisante un dosage colorimétrique de salicylate de sodium, il faut opérer avec des quantités de ce sel comprises entre 10 et 100 γ par cm³ de solution.

TABLEAU III

Concentrations en salicylate de sodium exprimées en γ	Chiffres lus au tambour de l'électro-photomètre de MEUNIER
10	28
25	93
50	152
75	234
100	294
250	328
500	338
750	376
1.000	416

TABLEAU IV

Concentrations en salicylate de sodium exprimées en γ	Chiffres lus au tambour de l'électro-photomètre de MEUNIER
10	28
20	58
30	90
40	122
50	154
60	192
70	228
80	266
90	296
100	298

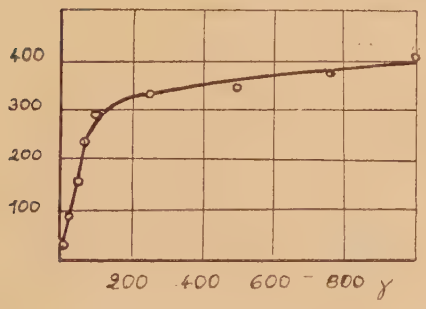


FIG. 3.

Courbe représentative des variations de l'intensité de la coloration du milieu (unités MEUNIER) en fonction de la quantité de salicylate mise en jeu.

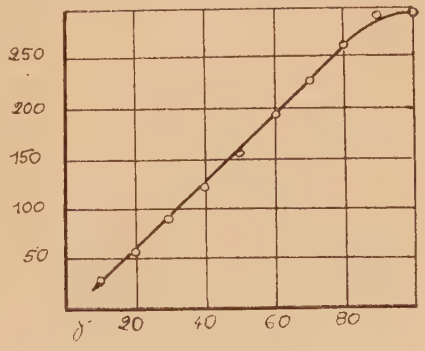


FIG. 4.

Courbe représentative des variations de l'intensité de la coloration du milieu (unités MEUNIER) en fonction de la quantité de salicylate mise en jeu.

D. — INFLUENCE JOUÉE PAR LE *p*H DU MILIEU SUR LA RÉACTION

Nous avons préparé dix-neuf échantillons identiques d'une solution de salicylate de sodium à 65 γ par cm^3. A chacun de ces échantillons, nous avons ajouté une même dose de réactif, puis des quantités variables, soit d'acide sulfurique dilué, soit de soude diluée. Partout nous avons complété à un même volume avec de l'eau distillée, et nous avons mesuré l'intensité de la coloration et le *p*H de nos diverses solutions.

Dans le tableau V se trouvent nos résultats auxquels correspond la courbe de la figure 5.

L'examen du tableau et de la figure montre que le facteur *p*H joue un rôle essentiel dans l'intensité de la coloration. C'est à *p*H 3 environ que la coloration est optimum. La technique que nous avons utilisée dans nos recherches ultérieures tient compte de cet important facteur (*).

(*) En effet, dans la technique de Brodie, la réaction colorée s'opère à *p*H 3,3.

TABLEAU V

p*H*	Chiffres lus au tambour de l'électrophotomètre de Meunier
1,4	5
1,6	13
1,7	24
1,8	35
1,9	58
2,1	93
2,2	109
2,3	157
2,7	198
2,9	203
3	202
3,1	200
3,2	198
3,5	180
3,8	158
4,1	134
4,5	124
5,8	72
6,8	40

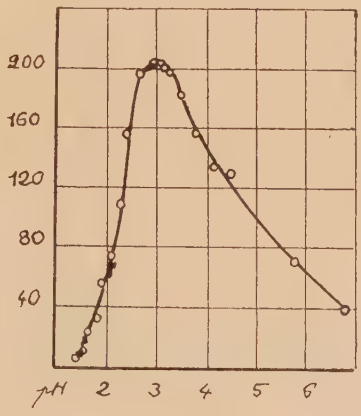


Fig. 5.

Courbe représentative des variations de l'intensité de la coloration du milieu (unités Meunier) en fonction du *p*H.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES DE LA PREMIÈRE PARTIE

Dans la première partie, nous avons passé en revue les différents types de techniques permettant le dosage du salicylate de sodium dans le sérum sanguin. Nous avons, en outre, effectué des essais sur les divers facteurs susceptibles d'influencer la réaction colorée utilisant le perchlorure de fer. Après l'exposé de nos résultats, il importe de conclure sur la valeur des différentes techniques et sur celles qui paraissent susceptibles d'effectuer le dosage dans les meilleures conditions d'exactitude et de simplicité.

Nous nous sommes arrêté aux méthodes colorimétriques; nous allons en examiner rapidement les raisons :

a) Les méthodes pondérales ou volumétriques s'avèrent moins commodes que les techniques colorimétriques. De plus, elles nous semblent présenter un inconvénient dû à la présence dans le sérum sanguin de composés phénoliques autres que l'acide salicylique; il conviendrait donc d'effectuer préalablement une extraction de l'acide salicylique, ce qui compliquerait encore la technique de dosage. Enfin, elles nécessitent la mise en œuvre d'un matériel assez important.

b) Les méthodes physiques, plus précises que les précédentes, surtout après une extraction de l'acide salicylique, ne pouvaient que nous tenter, mais nous ne disposions pas du matériel nécessaire.

c) Il nous restait alors les méthodes colorimétriques. Celles-ci, d'usage répandu, avaient déjà rendu les plus grands services entre les mains de chercheurs éclairés.

Il y avait alors lieu d'envisager le choix entre les méthodes directes par simple dilution du sérum après acidification et addition du réactif et celles prévoyant au préalable le passage de l'acide salicylique dans un solvant approprié.

Nous avons éliminé les premières parce que des essais effectués sur des sérums dilués au dixième ne nous avaient pas donné de bons résultats. Le gain en sensibilité n'était pas suffisamment appréciable pour détrôner, à notre avis, les méthodes par extraction. De plus, un autre inconvénient nous apparut : nous avons vu précédemment le rôle essentiel joué par le facteur *p*H sur l'intensité de la réaction colorée; or, la plupart des auteurs effectuant la réaction directement sur le sérum dilué ne tiennent pas compte des substances tampons présentes (phosphates, bicarbonates, amino-acides, protéines, etc.), si bien que le *p*H auquel se trouve le milieu est souvent loin de l'optimum. Il fallait donc, ou bien extraire l'acide salicylique par un solvant approprié après acidification du sérum, ou bien, comme le fait Galimard, opérer en présence d'alcool bouillant pour « décoller » des protéines puis libérer tout l'acide salicylique.

La micro-méthode de Galimard à l'alcool bouillant nous a rendu des services mais ne nous a pas paru exempte de critiques. Rappelons qu'après avoir épuisé à chaud son échantillon de sérum par de l'alcool, l'auteur évapore le solvant à sec et reprend le résidu par de l'eau; il effectue alors la réaction colorée. La solution aqueuse ainsi obtenue est trouble, à cause des lipides contenus dans le résidu; ce trouble constitue un sérieux inconvénient pour le dosage colorimétrique, ainsi que son auteur l'a d'ailleurs reconnu; il est vrai que l'on peut laisser séparer les substances gênantes et effectuer la réaction colorée après vingt-quatre heures (Galimard). D'autre part, la coloration violette obtenue dans

un milieu aussi hétérogène ne reste pas très longtemps constante. Enfin, l'auteur évapore l'alcool jusqu'à siccité, ce qui risque de conduire à des résultats par défaut, car l'« évaporation à siccité altère le salicylate », fait déjà signalé par FREDERICHSEN [21] et même par GALIMARD [22].

Un autre point de cette technique n'a pas manqué d'attirer notre attention : la solution de perchlorure de fer mise en jeu; nous avons vu précédemment le rôle joué par la concentration en fer et l'acidité du milieu sur l'intensité de la réaction; or, la plupart des auteurs ne semble pas attacher au réactif l'importance qui lui revient : les doses et la solution ferrique utilisées sont souvent mal définies. La solution officinale de chlorure ferrique (selon le Codex) contient sensiblement 26 p. 100 de chlorure ferrique supposé anhydre, soit 9 p. 100 de fer. Cette solution ne présente point un caractère de stabilité parfait; aussi PELLEGRINI [49] préfère-t-il préparer son réactif avec du sel pur (perchlorure de fer à 6 molécules d'eau), et BRODIE avec du nitrate ferrique pur. Il faut aussi ne pas oublier, et la majorité des auteurs s'en sont rendus compte, d'ajouter au réactif de l'acide chlorhydrique ou azotique pour éviter l'hydrolyse du sel ferrique.

C'est pour ces raisons qu'après avoir utilisé le réactif de GALIMARD, nous avons préféré adopter celui de BRODIE (*) dont les données nous sont apparues beaucoup plus précises.

La méthode de BRODIE, que nous avons le plus souvent utilisée dans nos travaux, nous a donné de très bons résultats. Néanmoins, nous croyons utile d'émettre quelques considérations générales sur cette technique et sur le choix du solvant organique utilisé. BRODIE recommande l'emploi, soit du dichloréthylène, soit du tétrachlorure de carbone, avec une légère préférence pour le premier solvant. Dans son mémoire, l'auteur donne d'ailleurs des renseignements

(*) 0,25 cm³ de réactif au nitrate ferrique à 1 p. 100 dans une solution 0,07 N d'acide azotique.

sur les qualités de ces deux solvants qu'il ne nous paraît pas superflu de rappeler :

1° Le coefficient de partage eau/tétrachlorure et eau/dichloréthylène est sensiblement le même, avec un léger avantage pour le premier solvant.

2° Si le mélange contient, en outre, du plasma, le résultat n'est plus tout à fait identique et le coefficient de partage est plutôt en faveur du dichloréthylène (*). C'est la raison pour laquelle Brodie opte plutôt pour le premier solvant. Il convient de faire remarquer que le tétrachlorure de carbone présente un avantage, celui de ne pas extraire l'acide salicylurique qui se trouve toujours en faible quantité dans le sérum salicylé et que l'on considère habituellement comme un produit d'élimination. L'acide salicylurique est extrait partiellement par le dichloréthylène : pour cette raison, nous avons adopté personnellement le tétrachlorure de carbone, qui nous a donné entière satisfaction.

Nous nous permettrons encore d'attirer l'attention sur quelques points de détails techniques que Brodie ne décrit pas dans sa méthode et dont l'importance nous paraît loin d'être négligeable.

Il arrive que certains sérums fassent apparaître, par agitation avec le tétrachlorure de carbone, de solides émulsions qui rendent le dosage pratiquement impossible. Lorsque cela se produit, il faut opérer sur de plus faibles quantités de sérum, au risque de diminuer un peu la précision du dosage; d'autre part, il importe, lorsqu'on ajoute l'acide au sérum, d'opérer très lentement en agitant, de façon à éviter la formation de grumeaux qui risqueraient de gêner considérablement l'extraction de l'acide salicylique. De plus, Brodie indique d'attendre cinq minutes entre l'addition de l'acide chlorhydrique et l'extraction avec le solvant organique. Quelques essais nous ont montré qu'il était préférable

(*) Des essais personnels avec le trichloréthylène nous ont donné d'excellents résultats; le coefficient de partage paraissant encore meilleur avec ce solvant.

d'attendre un peu plus longtemps (une demi-heure environ), la libération de l'acide salicylique dans un milieu hétérogène comme le sérum n'étant pas instantanée.

Enfin, il est une précaution essentielle : c'est d'éliminer parfaitement la phase aqueuse et le léger coagulum qui apparaît à l'interface eau acidifiée-solvant. Cette remarque est essentielle, car si l'on entraînait avec le solvant des traces de la phase aqueuse ou du coagulum, on acidifierait le milieu au delà du *p*H optimum de la réaction colorée, et le résultat du dosage s'en ressentirait.

Compte tenu des remarques ci-dessus, la méthode de Brodie se montre susceptible de donner d'excellents résultats. Sa sensibilité est satisfaisante si l'on opère sur une prise d'essai de plasma contenant une quantité de salicylate d'au moins 50 γ par cm^3. De plus, la méthode de Brodie s'est toujours montrée bien fidèle, ce qui doit permettre de suivre aisément et en sécurité la salicylémie chez les malades traités.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DE L'ADSORPTION DU SALICYLATE DE SODIUM SUR LES PROTÉINES DU SÉRUM SANGUIN

Après avoir constaté la valeur de la technique de Brodie et de ses collaborateurs, nous avons désiré étudier les effets éventuels apportés par le salicylate de sodium sur les constituants sériques.

Nous nous sommes tout d'abord demandé sous quel état se trouvait le salicylate sérique, s'il restait libre ou bien, au contraire, combiné avec quelques constituants sanguins. Quelques tentatives de recherches avaient été effectuées jadis sur cette question, mais n'avaient pas apporté de conclusion bien nette. Pour cette raison, nous avons effectué des travaux dans ce domaine.

Alors que nos recherches étaient terminées, Galimard [25] a publié dans le dernier bulletin de la Société de Chimie biologique un mémoire sur cette question. Les conclusions de cet auteur sont en parfait accord avec les nôtres.

Après avoir passé en revue et discuté les travaux effectués sur l'état du salicylate dans le sang, nous exposerons nos recherches expérimentales.

CHAPITRE PREMIER

Travaux antérieurs sur l'état du salicylate de sodium dans le sérum sanguin.

De très anciennes recherches effectuées par divers auteurs (Feser et Friedberger [17], Fleischer [18] et Faisky [16]) avaient laissé supposer que, dans le sang, le salicylate de sodium se trouvait combiné aux protéines.

Les arguments en faveur de cette assertion étaient les suivants :

a) Du sang salicylé agité avec de l'éther ne livre pas à ce solvant l'acide salicylique qu'il contient; on connaît pourtant la grande solubilité de cet acide dans l'éther.

b) Le passage dans l'éther de l'acide salicylique devient possible après protéolyse.

Ces mêmes auteurs avaient d'ailleurs décrit un albuminate de salicyle (*), dont Faisky avait même donné la formule.

Les arguments de ces auteurs ne se montrent pas exempts de critiques, car dans le sang circulant l'ion salicylique se trouve en majeure partie à l'état de salicylate de sodium, insoluble dans l'éther. D'autre part, la protéolyse, comme toutes celles effectuées à cette époque, était très probablement une protéolyse pepsique, donc effectuée en milieu

(*) Albuminate est pris ici dans un sens très général, correspondant au terme actuel de protéinate.

acide et libérant ainsi l'acide salicylique, soluble dans l'éther.

Plus tard, Jacoby [34] arrive aux mêmes conclusions que les précédents auteurs grâce aux constatations suivantes :

a) Lorsqu'on coagule par la chaleur un sérum salicylé et qu'ainsi on dénature les protéines, le coagulum protéidique contient très peu de salicylate.

b) Le précipité protéidique obtenu à l'aide du sulfate d'ammonium à demi-saturation (globulines) n'entraîne avec lui que des traces de salicylate, tandis que le précipité formé par saturation complète en ce sel (albumines + globulines) entraîne avec lui la majeure partie du salicylate. Donc, selon Jacoby, le salicylate se trouve combiné aux albumines.

Jacoby a effectué, en outre, des expériences *in vitro* sur le sérum de Lapin, et il a constaté que la précipitation totale des protéines sériques n'entraînait pas le salicylate qui restait dans les eaux-mères : l'auteur en a conclu que la combinaison salicylate-albumine se produit seulement *in vivo*.

Nous aurons l'occasion, au cours de notre étude expérimentale, d'infirmer cette dernière conclusion de Jacoby.

Les travaux de cet auteur, qui sont loin de manquer d'intérêt, surtout lorsqu'on tient compte de l'époque à laquelle ils ont été effectués, sont passés inaperçus et la grande majorité des auteurs qui ont étudié l'adsorption du salicylate par les protéines ne mentionnent pas les recherches précitées de ce chercheur.

En 1923, Chabanier, Lebert et Lobo-Onel [8] mettaient en évidence d'une manière nette et indiscutable l'affinité exercée par les protéines sériques vis-à-vis du salicylate de sodium.

Ces auteurs préparaient un certain nombre de dialyseurs dans lesquels ils disposaient une même quantité de sérum et un meme poids de salicylate de sodium. Les dialyseurs étaient placés dans une solution isotonique contenant cette

substance au même titre que précédemment. Donc, au début de l'opération, le taux du salicylate de sodium était identique à l'intérieur et à l'extérieur du dialyseur. Après des temps variés, les auteurs dosaient le salicylate dans le liquide extérieur et constataient que le taux en ce sel diminuait continuellement pour atteindre des chiffres très bas : le salicylate de sodium avait donc été « attiré » par le sérum. Chabanier et ses collaborateurs montraient encore que la quantité de salicylate fixé était proportionnelle à la quantité de sérum mis en jeu.

Ils apportent encore de nouveaux arguments en faveur d'une combinaison protéines sériques - salicylate, grâce à des expériences *in vivo*.

Après avoir étudié la constante uréo-secrétoire de l'acide salicylique en comparaison avec celle de l'urée, ils effectuent des recherches sur la vitesse d'élimination de l'acide salicylique. Les résultats qu'ils obtiennent leur permettent de conclure que le rein seul ne saurait être mis en cause pour expliquer la lenteur relative d'élimination, et que certainement des substances ont tendance à retenir le salicylate. Ils apportent ainsi un nouvel argument en faveur de la formation de complexes *in vivo* protéines - salicylate. A cette occasion, ils signalent que la quantité de salicylate fixée par les protéines paraît moins grande *in vivo* qu'*in vitro*. Les expériences de Chabanier, Lebert et Lobo-Onel ont été battues en brèche par Coquoin [12] qui ne reconnaît aux protéines aucun pouvoir adsorbant vis-à-vis du salicylate. Cependant, les travaux de Coquoin, que nos propres recherches infirment, ne nous paraissent pas exemptes de critiques : cet auteur a mis en jeu une technique de dosage du salicylate très délicate (rouge de Lautemann) ; d'autre part, il a utilisé dans ses premiers travaux des dialyseurs perméables aux protéines.

D'ailleurs, les recherches auxquelles nous allons faire allusion à présent confirment les conclusions de Chabanier et de ces collaborateurs.

Galimard admet la fixation du salicylate sur les protéines et cherche, dans une première série d'essais, à préciser le mode de liaison entre ces deux constituants : mettant en jeu la réfractométrie et appliquant à cette technique la règle d'additivité [24], Galimard conclut qu'il n'existe pas de combinaison chimique entre les protéines et le salicylate; il s'agit simplement, soit d'un mélange, soit d'une adsorption. Dans une seconde série d'essais, Galimard étudie quantitativement le pouvoir adsorbant des protéines sériques vis-à-vis du salicylate. Il trace même la courbe représentative des variations du pourcentage de salicylate adsorbé pour un même poids de protéines en fonction de la concentration en ce sel. L'examen de la courbe permet de conclure que, pour des doses très faibles de salicylate, il n'y a que peu d'adsorption (*); celle-ci se produit seulement lorsque la concentration en salicylate atteint un certain taux. Pour Galimard, le complexe protéines-salicylate ne pourrait donc se produire que si les deux constituants se trouvent en concentration suffisante. Nos expériences, que l'on trouvera décrites plus loin, ne sont pas tout à fait d'accord avec celles de cet auteur et se montrent plutôt compatibles avec celles de Smith [56]. Ce dernier, en effet, a étudié systématiquement l'adsorption du salicylate par les protéines et a pu montrer ainsi que si le sérum contient de petites quantités de salicylate (200 mg. par litre de sérum), 80 p. 100 environ du sel se fixe sur les protéines, tandis que s'il en contient de plus fortes doses (500 mg. par litre), 50 p. 100 seulement du sel est adsorbé sur les protéines.

Smith constate l'identité du phénomène dans ses expériences *in vivo* et *in vitro*. Les résultats se trouvent encore confirmés par les ingénieuses expériences de Lester, Lolli et Greenberg [38] qui utilisent des ultra-filtres en cellophane montés suivant une technique personnelle.

Enfin, une toute récente publication de Galimard [25]

(*) Des conclusions voisines sont obtenues par Herrera-Ramos [29].

vient d'apporter de nouvelles précisions. Utilisant la technique réfractométrique de Jonnard [35], Galimard étudie quantitativement la fixation du salicylate de sodium sur les protéines, et il remarque qu'il existe une différence individuelle extrêmement sensible dans le pouvoir fixateur vis-à-vis du salicylate entre les divers sérums étudiés.

Galimard effectue enfin des recherches sur les fractions albumines et globulines du sérum, séparées selon la technique de Machebœuf [40], et conclut que la fraction sérum-albumine adsorbe cinq à sept fois plus de salicylate que la fraction globulines. C'est à un résultat à peu près identique que nous sommes parvenu en même temps que Galimard, par une technique différente (*).

Avant Galimard et nous-même, aucun auteur n'avait mis en évidence nettement ce pouvoir d'adsorption de la fraction sérum-albumine seule vis-à-vis du salicylate de sodium. Il faut rendre justice à Jacoby qui, avec des moyens rudimentaires, avait soupçonné cette propriété de la sérum-albumine; cependant, son travail n'a été cité qu'exceptionnellement.

(*) On sait aujourd'hui que les albumines représentent le véhicule de nombreuses substances.

CHAPITRE II

Recherches sur le pouvoir adsorbant des protéines sériques vis-à-vis du salicylate de sodium « in vitro ».

Lorsque nous avons commencé nos recherches sur le pouvoir adsorbant des protéines vis-à-vis du salicylate de sodium, un certain doute planait encore sur cette propriété.

Mettant en jeu les techniques de fractionnement des protéines sériques par les méthodes de relargage, nous avons tout d'abord cherché à savoir si les fractions protéidiques séparées d'un sérum salicylé entraînaient avec elles du salicylate de sodium. Il importait donc, tout d'abord, de vérifier que le sel mis en jeu pour le relargage n'avait aucun pouvoir précipitant vis-à-vis du salicylate de sodium.

Nous nous sommes servi, pour la séparation des protéines, du sulfate d'ammonium (technique d'Hofmeister [32]). Nous avons alors effectué l'expérience suivante : nous avons préparé six échantillons de sulfate d'ammonium saturé et, à chaque échantillon, nous avons ajouté des quantités croissantes de salicylate de sodium. Nous avons alors noté qu'à une concentration inférieure à 37,5 g. par litre, le salicylate de sodium se dissout parfaitement dans la solution saturée de sulfate d'ammonium. Or, dans aucune de nos expériences, nous n'atteindrons une concentration aussi élevée en salicylate, nos concentrations les plus grandes étant de 4 g. par litre, soit près de dix fois moins.

Nous avons eu l'occasion, au cours de nombreuses expériences, d'effectuer des dosages comparatifs en présence ou en l'absence de sulfate d'ammonium, et nous avons constaté que ce sel n'apportait aucune perturbation notable. Nous l'avons donc adopté de préférence à l'acide trichloracétique, mis en œuvre par GALIMARD [24] dans ses premières recherches, et dont le rôle sur le complexe albumine-salicylate est loin d'être négligeable.

I. — ESSAIS SUR LE SÉRUM DE CHEVAL

Après avoir ainsi démontré que le sulfate d'ammonium ne gênait pas la solubilité du salicylate, nous avons abordé une première série d'expériences dont voici le protocole.

Première série.

A 10 cm³ de sérum de Cheval nous ajoutons 1 cm³ de solution de salicylate de sodium à 4 p. 100. Après vingt-cinq minutes de contact, nous plaçons un volume égal (11 cm³) de solution saturée et neutralisée de sulfate d'ammonium; les globulines précipitent. Nous les éliminons par centrifugation. Nous prélevons 1 cm³ des eaux-mères (contenant les albumines) et nous dosons le salicylate de sodium. Nous saturons le reste des eaux-mères à l'aide de sulfate d'ammonium pulvérisé. Nous provoquons ainsi la précipitation totale de la fraction albumine. Les nouvelles eaux-mères, ne contenant plus de protéines (vérifié à l'aide d'acide trichloracétique), sont filtrées puis traitées en vue du dosage du salicylate de sodium. Il importe de noter que, parallèlement, nous effectuons une expérience témoin en remplaçant le sérum par de l'eau physiologique.

Résultats obtenus :

Eaux-mères des globulines	1,50 mg. par cm³ (*)
Témoin	1,53 —

(*) Nos chiffres seront toujours exprimés en acide salicylique.

Acide salicylique fixé par les globulines	0,03 mg. par cm³	
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	2	
Eaux-mères des albumines	0,30	—
Témoin	1,40	—
Acide salicylique fixé par les albumines	1,10	—
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	78,5	

Ces résultats nous permettent diverses remarques :

a) La fraction globuline entraîne dans sa précipitation des quantités minimes de salicylate de sodium, puisque les eaux-mères des globulines contiennent la presque totalité de salicylate (1,50 mg. pour 1,53 mg. par cm³).

b) La fraction albumine entraîne dans sa précipitation une abondante quantité de salicylate puisque les eaux-mères des albumines ne contiennent plus que 0,30 mg., alors que le témoin en contient encore 1,40 mg. par cm³, soit près de cinq fois plus.

Après avoir vérifié par de nouvelles expériences identiques, que nous ne rapportons pas ici, le bien-fondé de nos conclusions, nous avons abordé une nouvelle série d'essais.

Deuxième série.

Cette fois, nous avons cherché à éviter la dilution du milieu due à l'addition de la solution saturée de sulfate d'ammonium, que nous avons remplacée par ce même sel à l'état solide.

Nous avons prélevé 15 cm³ de sérum de Cheval auquel nous avons ajouté 1 cm³ de solution de salicylate de sodium à 4 p. 100. Ensuite, nous l'avons additionné de 5,5 g. de sulfate d'ammonium pulvérisé (demi-saturation). Après dissolution du sel, les globulines précipitent; nous les

recueillons par centrifugation et nous dosons le salicylate dans les eaux-mères. Le reste des eaux-mères est saturé de sulfate d'ammonium puis soumis à la centrifugation (élimination des albumines) ; sur les nouvelles eaux-mères, nous effectuons le dosage du salicylate de sodium.

Résultats obtenus :

Eaux-mères des globulines	1,65 mg. par cm³	
Témoin	1,69	—
Acide salicylique fixé par les globulines	0,04	—
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	2,3	
Eaux-mères des albumines	0,11	—
Témoin	1,54	—
Acide salicylique fixé par les albumines	1,43	—
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	92,8	

Ces résultats, qui ont été vérifiés par d'autres expériences, confirment en tous points la première série d'essais.

Bien qu'ayant montré au début de ce chapitre que le sulfate d'ammonium saturé ne précipitait pas le salicylate de sodium, nous avons effectué une troisième série d'essais dans laquelle nous avons évité la précipitation des albumines par saturation.

Troisième série.

Dans ces expériences, nous avons précipité la fraction des albumines à partir des eaux-mères de précipitation des globulines en ajoutant un très léger excès de sulfate d'ammonium et en amenant le *p*H, à l'aide d'acide sulfurique 2 N, aux environs de 3,9 (virage d'un papier au rouge Congo [40]).

Nous avons effectué parallèlement un témoin, afin d'éli-

miner le rôle éventuel de l'acidification sur la stabilité de l'ion salicylique (*).

Eaux-mères des globulines	1,30 mg. par cm³	
Témoin	1,32	—
Acide salicylique fixé par les globulines	0,02	—
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	1,5	
Eaux-mères des albumines	0,11	—
Témoin	0,51	—
Acide salicylique fixé par les albumines	0,40	—
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	78,2	

Ils confirment totalement les expériences précédentes.

Lorsque l'on examine de près les résultats que nous avons obtenus, on s'aperçoit que la fraction globuline entraîne quand même dans sa précipitation de très petites quantités de salicylate de sodium. Il était donc intéressant de savoir si les protéines adsorbant cette petite quantité de salicylate appartenaient aux euglobulines ou bien aux pseudo-globulines.

Quatrième série.

A un sérum de Cheval, nous avons appliqué la technique de Porges, Fuld et Spiro [52], afin de préparer les trois fractions suivantes :

Euglobulines (insolubles dans le sulfate d'ammonium au tiers de saturation) ;

Pseudo-globulines (précipitant entre le tiers et la demi-saturation) ;

Albumines (solubles dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation).

(*) L'addition de cet acide au témoin n'a d'ailleurs provoqué l'apparition d'aucun trouble.

Nous avons remis ces trois fractions en solution, de telle façon que leur titre en protéines soit de 3 p. 100. A chacune des solutions ainsi obtenues, nous avons ajouté une même dose de salicylate de sodium, puis nous avons précipité les protéines. Nous avons alors dosé le salicylate dans les eaux-mères.

Résultats obtenus :

Eaux-mères des euglobulines	1,54	mg. par cm³
Témoin	1,56	—
Acide salicylique fixé	0,02	—
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	1,2	
Eaux-mères des pseudo-globulines..	1,54	—
Témoin	1,55	—
Acide salicylique fixé	0,01	—
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	0,6	
Eaux-mères des albumines	0,18	—
Témoin	1,51	—
Acide salicylique fixé	1,33	—
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	88	

Il ressort de nos essais que la fraction pseudo-globuline présente un léger pouvoir adsorbant vis-à-vis du salicylate de sodium. Il convient cependant d'être extrêmement prudent dans l'interprétation de ce phénomène, car les fractions protéidiques, séparées par la technique de Porges, Fuld et Spiro, sont loin d'être des fractions pures. Les pseudo-globulines préparées par cette technique contiennent des albumines ainsi que l'ont montré divers auteurs (Mac Farlane [39], Hewitt [31], Pérez [50], Tayeau et Martin [65]).

Il ressort de tous ces travaux que c'est surtout la fraction sérum-albumine qui fixe le salicylate de sodium *in vitro*.

Une dernière série d'essais met bien en évidence cette propriété de la fraction sérum - albumine.

Cinquième série.

Nous avons effectué un essai à partir d'une solution de sérum - albumine pure à laquelle nous avons ajouté du salicylate de sodium, puis nous avons précipité les protéines suivant la technique de Machebœuf [40]. Nous avons dosé le salicylate dans les eaux-mères.

Résultats obtenus :

Eaux-mères de précipitation	0,56 mg. par cm³
Témoin	1,20 —
Acide salicylique fixé	0,64 —
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	53,3

Cette expérience confirme encore le pouvoir adsorbant des albumines.

II. — ESSAIS SUR LE SÉRUM DE LAPIN

Dans l'étude historique que nous avons effectuée au début de la deuxième partie, nous avons rapporté les travaux de Jacoby [34]. Nous avons signalé l'une des conclusions émises par cet auteur, à savoir que si le salicylate se fixe sur les albumines sériques *in vivo,* il n'en est pas de même *in vitro.* L'auteur avait effectué ces opérations chez le Lapin.

Devions-nous donc conclure, après lecture du mémoire de Jacoby, que le sérum de Lapin se conduisait, vis-à-vis du salicylate de sodium *in vitro,* d'une façon toute différente du sérum de Cheval ?

Cette question nous a incité à étudier l'adsorption éventuelle *in vitro* du salicylate de sodium par le sérum de Lapin. Nous avons prélevé du sérum à deux lapins normaux et, mettant en jeu le mode opératoire décrit pour le sérum de

Cheval dans la première série d'essais, nous avons obtenu les résultats suivants :

	Lapin 1	Lapin 2
	(Résultats exprimés en mg. par cm³)	
Eaux-mères des globulines	1,58	1,57
Témoin	1,59	1,57
Acide salicylique fixé	0,01	0
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	0,6	0
Eaux-mères des albumines	0,26	0,37
Témoin	1,44	1,45
Acide salicylique fixé	1,18	1,07
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	81,9	74,1

Ces résultats obtenus avec le sérum de Lapin se montrent tout à fait comparables à ceux trouvés avec le sérum de Cheval.

La conclusion de Jacoby se trouve donc infirmée.

III. — ESSAIS SUR LE SÉRUM DE POULE

Désirant savoir si le pouvoir adsorbant exercé par les albumines sériques vis-à-vis du salicylate était susceptible d'être étendu à d'autres espèces de vertébrés, nous avons effectué une expérience sur du sérum d'oiseau (Poule).

Nous avons toujours suivi le même mode opératoire.

Résultats obtenus :

Eaux-mères des globulines	1,56 mg. par cm³
Témoin	1,59 —
Acide salicylique fixé	0,02 —
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	1,5
Eaux-mères des albumines	0,42 —

Témoin	1,41 mg. par cm³
Acide salicylique fixé	0,99 —
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	70,2

Ces résultats obtenus avec le sérum de Poule sont identiques aux précédents provenant de sérums de Cheval et de Lapin.

IV. — ESSAIS SUR L'HÉMOGLOBINE

Après avoir ainsi démontré le pouvoir adsorbant des albumines sériques vis-à-vis du salicylate, nous nous sommes demandé si cette propriété était spécifique des albumines et si elle n'était pas susceptible d'être étendue à d'autres protéines. Nous avons pensé étudier l'hémoglobine.

Quelques recherches avaient déjà été effectuées sur la fixation éventuelle du salicylate par les hématies : Frederichsen [21] avait noté la faible quantité de salicylate contenu dans les hématies par rapport au plasma d'un sang salicylé *in vivo* comme *in vitro*. Herrera-Ramos [30] avait effectué des mesures quantitatives laissant prévoir un parallélisme entre la teneur en hémoglobine des hématies et le salicylate fixé par ses éléments. D'après les travaux de Smith [56], il apparaît que les hématies ne présentent aucune affinité pour le salicylate, car leur teneur en ce sel est identique à la teneur du plasma en salicylate libre (non adsorbé par les protéines). Enfin, cette conception paraissait définitivement vérifiée à la suite des travaux de Lester, Lolli et Greenberg [38] qui ne reconnaissaient aux hématies aucun pouvoir fixateur vis-à-vis du salicylate. Ces opinions divergentes nous ont amené à étudier l'adsorption éventuelle du salicylate par l'hémoglobine.

Nous avons préparé une solution d'hémoglobine de Bœuf, selon la technique de Anson [1], à 33,1 p. 100. A partir de cette solution mère, nous avons préparé deux solutions plus diluées : l'une à 6,62 p. 100, l'autre à 3,30 p. 100.

A 10 cm³ de chacune de ces solutions nous avons ajouté 1 cm³ de solution de salicylate à 4 p. 100 puis, dans les deux cas, nous avons précipité l'hémoglobine par addition de 11 cm³ de solution saturée et neutralisée de sulfate d'ammonium et 5 g. du même sel en poudre. Dans les eaux-mères de centrifugation nous avons dosé le salicylate.

Résultats obtenus :

Solution 1 (à 6,62 p. 100 en Hb)..	0,67 mg. par cm³	
Témoin	1,42	—
Acide salicylique fixé	0,45	—
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	52,6	
Solution 2 (à 3,31 p. 100 en Hb)..	0,71 mg. par cm³	
Témoin	1,43	—
Acide salicylique fixé	0,72	—
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	50,3	

Il apparaît donc, à la lecture de ces chiffres, que l'hémoglobine qui, vis-à-vis du sulfate d'ammonium, se conduit comme la sérum albumine, possède la propriété de fixer le salicylate de sodium *in vitro*.

V. — ETUDE QUANTITATIVE DU POUVOIR ADSORBANT DES PROTÉINES SÉRIQUES VIS-A-VIS DU SALICYLATE DE SODIUM *IN VITRO*.

Nous n'avons pas manqué, dans notre étude historique, d'attirer l'attention du lecteur sur la discordance qui existe entre les travaux de quelques auteurs relatifs à cette étude quantitative : rappelons que Galimard estime que, si la concentration sérique en salicylate atteint un taux très bas, ce sel se fixe à peine sur les protéines; il n'en est pas de même pour les concentrations plus élevées. Il ressort, au contraire, des travaux de Smith [56] que le pourcentage de

salicylate fixé s'avère plus important pour les petites concentrations sériques en ce sel que pour des plus grandes.

Nous avons voulu à notre tour étudier le phénomène. Pour cela, nous avons repris nos expériences précédemment décrites, mais cette fois nous avons effectué parallèlement un certain nombre d'essais en mettant en jeu des concentrations croissantes de salicylate de sodium.

Voici les résultats que nous avons obtenus avec des échantillons de 10 cm³ de sérum.

TABLEAU VI

(Tous les chiffres ci-dessous sont exprimés en mg. par cm³.)

	Globulines			Albumines		
N°s	Ac. sal. fixé	Eaux-mères	Témoin	Ac. sal. fixé	Eaux-mères	Témoin
1	x (*)	x	x	x	x	x
2	0,01	0,05	0,06	x	x	0,02
3	0,01	0,12	0,13	0,04	0,01	0,05
4	0,02	0,20	0,22	0,11	0,01	0,12
5	0,03	0,33	0,36	0,16	0,02	0,19
6	0,02	0,54	0,56	0,27	0,04	0,32
7	0,04	0,66	0,70	0,41	0,07	0,48
8	0,10	0,98	1,08	0,51	0,08	0,59

p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.

N°s	Globulines	Albumines
1	x	x
2	15	x
3	11	81
4	9	88
5	8	86
6	3	85
7	5	85
8	9	86

(*) Le signe x indique que le dosage de l'acide salicylique n'a pu être fait en raison des trop faibles concentrations en présence.

L'examen du tableau montre que la proportion d'acide salicylique fixé par les albumines sériques est toujours à peu près la même, sauf pour des doses en acide salicylique élevées pour lesquelles elle diminue graduellement.

Nos résultats ne se trouvent pas en accord avec ceux de Galimard et se rapprochent au contraire de ceux de Smith; les chiffres ne sont pas tout à fait les mêmes, mais nous avons déjà signalé le comportement différent des divers échantillons de sérum mis en jeu. Nous avons, enfin, montré que l'hémoglobine présentait des propriétés adsorbantes vis-à-vis du salicylate de sodium.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

A l'aide de divers types d'expériences, nous avons démontré dans ce chapitre que le salicylate de sodium, ajouté à un sérum *in vitro,* se fixe presque exclusivement sur la fraction sérum-albumine. Nous avons étendu ce résultat à diverses espèces zoologiques : Cheval, Lapin, Poule; nous avons enfin montré que l'hémoglobine présentait des propriétés adsorbantes vis-à-vis du salicylate de sodium.

CHAPITRE III

Recherches sur le pouvoir adsorbant des protéines vis-à-vis du salicylate de sodium « in vivo ».

Dans le chapitre précédent, nous avons passé en revue les recherches précédemment effectuées montrant le pouvoir adsorbant des protéines sériques vis-à-vis du salicylate *in vivo* et *in vitro*. Nous avons signalé ensuite que, si, *in vitro*, on ajoute à un sérum du salicylate de sodium, ce sel se fixe presque exclusivement sur la fraction albumine. Allait-il en être de même *in vivo* ?

Nous avons effectué quelques expériences sur le sérum de malades traités par le salicylate de sodium.

Notre mode opératoire a été le suivant :

Un certain volume de sérum salicylé est additionné d'un volume égal de solution saturée et neutralisée de sulfate d'ammonium; les globulines précipitent; on les recueille par centrifugation. On prélève une partie aliquote des eaux-mères pour doser le salicylate. Le reste des eaux-mères est additionné d'un léger excès de sulfate d'ammonium et d'acide sulfurique 2 N, de telle façon que le *p*H soit voisin de 3,9 (*). Les albumines précipitent. On les élimine par centrifugation, tandis que sur les eaux-mères de précipitation de ces albumines, on effectue le dosage du salicylate.

(*) Des essais préliminaires nous renseignent sur la quantité exacte d'acide à ajouter.

Chaque expérience comporte un témoin préparé exactement de la même façon que précédemment, mais sans centrifugation.

Nous ne pouvons pas rapporter ici toutes nos expériences; nous nous contenterons de signaler les résultats de trois d'entre elles (tableau VII).

TABLEAU VII

	Sérums		
	I	II	III
Eaux-mères des globulines	0,20	0,07	0,12 (*)
Témoin	0,20	0,08	0,13
Ac. salicylique fixé sur les globulines.	0,00	0,01	0,01
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	0,00	12,5	7,7
Eaux-mères des albumines	0,04	0,02	0,01
Témoin	0,18	0,05	0,10
Ac. salicylique fixé sur les albumines.	0,14	0,04	0,09
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total.	77,7	66,6	90,0

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Ces résultats montrent d'une façon nette que, *in vivo* comme *in vitro*, le salicylate de sodium se fixe presque exclusivement sur la fraction sérum-albumine.

(*) Résultats exprimés en mg. par cm^3.

CHAPITRE IV

Recherches sur la nature des liaisons protéines-salicylate dans le sérum salicylé.

Nous venons de voir que, *in vivo* comme *in vitro*, le salicylate des sérums salicylés se trouve fixé aux albumines sériques.

Quel est donc le mode de liaison unissant ces deux constituants ?

On peut penser tout de suite à une liaison de type chimique due à la présence dans l'acide salicylique d'une fonction phénol et d'une fonction acide. Une telle supposition doit être rejetée pour plusieurs raisons :

1° Le *p*H du milieu ne joue pas un rôle très important dans la stabilité de la liaison (Smith [56]).

2° Un lavage prolongé du complexe, à l'aide d'eau, décompose ce dernier.

3° Grâce à des mesures réfractométriques, Galimard [24] a pu montrer qu'il n'y avait pas de combinaison chimique entre les deux constituants.

Nous avons effectué diverses expériences *in vivo* et *in vitro* qui nous ont convaincu de la labilité de la liaison. Si, en effet, on soumet à la dialyse contre de l'eau courante le complexe sérum-albumine-salicylate, ce dernier constituant finit par s'éliminer et le contenu du dialyseur devient absolument exempt de salicylate.

Il semble donc s'agir simplement d'une adsorption. Cette adsorption est-elle du même type que celle unissant les lipides et les protéines dans le sérum ?

S'il en est ainsi, on doit pouvoir, en augmentant la surface adsorbante des protéines sériques, augmenter la capacité de fixation de ces protéines vis-à-vis du salicylate (*).

Nous avons cherché à le savoir. Pour cela, nous avons délipidé un sérum de Cheval par la méthode de Hardy et Gardiner [27], et nous avons comparé le pouvoir adsorbant de ce sérum délipidé avec celui du sérum natif; les deux sérums se trouvaient au même titre en protéines.

Chacun d'eux a été traité comme précédemment.

Voici nos résultats (tableau VIII) :

TABLEAU VIII

	Sérum n° I		Sérum n° II	
	Normal	Délipidé	Normal	Délipidé
Eaux-mères des globulines.	1,50	1,51	1,50	1,48 (**)
Témoin	1,53	1,53	1,53	1,53
Ac. salicylique fixé sur les globulines	0,03	0,02	0,03	0,05
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total	2,0	1,3	2,0	3,2
Eaux-mères des albumines..	0,45	0,60	0,34	0,33
Témoin	1,56	1,46	1,56	1,45
Ac. salicylique fixé sur les albumines	1,01	0,86	1,12	1,11
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total	69,0	58,0	76,0	76,0

(*) On sait qu'un sérum délipidé possède une surface adsorbante beaucoup plus élevée que le même sérum non délipidé (Tayeau et Rolland [67]).

(**) Résultats exprimés en mg. par cm^3.

Ces résultats montrent que la délipidation des protéines sériques n'augmente pas notablement le pouvoir adsorbant de ces dernières vis-à-vis du salicylate de sodium.

Nous avons désiré vérifier cette première conclusion par des expériences d'un autre type.

On sait qu'un sérum vieilli artificiellement par un séjour à l'étuve à 37° présente une surface adsorbante considérablement diminuée (Tayeau et Rolland [69]).

Il était donc intéressant de savoir si un vieux sérum adsorbait moins de salicylate qu'un sérum frais.

En utilisant toujours le même mode opératoire, nous avons effectué des expériences comparatives.

Voici nos résultats (tableau IX) :

TABLEAU IX

	Sérum frais		Sérum vieilli	
	I	II	I 30 j.	II 8 j.
Eaux-mères des globulines.	1,56	1,54	1,45	1,44 (*)
Témoin	1,57	1,55	1,55	1,56
Ac. salicylique fixé sur les globulines	0,01	0,00	0,10	0,11
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total	0,7	0,5	6,4	7,4
Eaux-mères des albumines..	0,44	0,32	0,48	0,46
Témoin	1,46	1,44	1,44	1,46
Ac. salicylique fixé sur les albumines	1,02	1,12	0,96	1,00
p. 100 d'acide salicylique fixé par rapport à l'acide salicylique total	69	77	66	68

Ces résultats montrent que le pouvoir adsorbant des protéines vis-à-vis du salicylate, après vieillissement, n'a pas subi de modification très notable.

(*) Résultats exprimés en mg. par cm^3.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

Les liaisons unissant la sérum-albumine au salicylate de sodium sont particulièrement labiles et se montrent très différentes de celles unissant les lipides et les protéines dans les cénapses lipido-protéidiques du sérum sanguin.

TROISIÈME PARTIE

ACTION DU SALICYLATE DE SODIUM SUR LES CÉNAPSES LIPIDO-PROTÉIDIQUES « IN VITRO » ET « IN VIVO »

Le sérum sanguin constitue un sérum aqueux limpide et homogène. Il contient cependant en dissolution une appréciable quantité de substances lipidiques (5 à 8 g. par litre) constituées par des glycérides, des phosphatides, des stérides et des stérols. Ces substances sont cependant insolubles dans l'eau. Elles doivent leur stabilité dans ce solvant au fait qu'elles se trouvent unies aux protéines pour former les cénapses lipido-protéidiques (Machebœuf [41]).

Les liaisons unissant lipides et protéines sériques présentent un certain degré de stabilité : on sait, en effet, que si l'on agite un sérum avec de l'éther, ce solvant, qui dissout pourtant très bien les lipides, ne peut en extraire qu'une infime quantité (Hoppe-Seyler [33]).

La stabilité de la liaison lipides-protéines a fait l'objet de nombreuses recherches (Machebœuf [41], Sandor [54], Delage [13], Tayeau [58, 62], Rebeyrotte [44]) qui ont permis de préciser le mode de liaison entre les lipides et les protéines. Ces deux constituants se trouvent unis entre eux grâce à l'affinité réciproque que présentent leurs groupements moléculaires homologues (icélomorphisme : Machebœuf [42]).

Si l'on fait arriver au contact des cénapses lipido-protéidiques des substances qui présentent une configuration moléculaire voisine de celle de certains lipides, ces substances peuvent prendre la place de ces derniers qui deviennent dès lors extractibles par l'éther :

a) Si, à du sérum, on ajoute en quantité convenable une solution d'un savon alcalin, une grande partie des lipides sériques devient extractible par l'éther (Machebœuf et Tayeau [45]).

b) Si, à du sérum, on ajoute une solution de saponoside de Sapindus, dont la constitution est voisine de celle du cholestérol, la totalité de cet alcool devient extractible par l'éther (Tayeau [59]).

Nous nous sommes alors demandé si le salicylate de sodium, grâce à son noyau hexagonal, ne pourrait pas se substituer au cholestérol sérique et permettre l'extraction de cet alcool par l'éther.

CHAPITRE PREMIER

Action du salicylate « in vitro » sur les cénapses lipido-protéidiques du sérum.

Les recherches bibliographiques que nous avions effectuées semblaient répondre affirmativement à la question précédemment formulée :

Charonnat [9] signale, en effet, que l'addition de salicylate de sodium *in vitro* à du sérum permet d'extraire le cholestérol par agitation avec de l'éther.

Nous avons repris les travaux de Charonnat. A divers échantillons de sérums, nous avons ajouté des quantités croissantes de salicylate, puis nous avons agité l'ensemble à plusieurs reprises avec de l'éther.

Nous avons recueilli les extraits éthérés et nous les avons dissous dans le chloroforme (purification). La solution chloroformique filtrée a été évaporée et le résidu desséché dans un exsiccateur jusqu'à poids constant. Sur l'extrait lipidique ainsi obtenu, nous avons effectué le dosage du cholestérol grâce à la réaction de Liebermann-Burchardt.

Voici les mélanges que nous avons effectués :

Ampoules	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Sérum (cm^3)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Solution de salicylate de sodium à 20 p. 100	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	5	10
Eau physiologique	10	9,5	9	8,5	8	7,5	7	6,5	5	0
Ether	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

Voici les résultats que nous avons obtenus :

TABLEAU X

Ampoules	Extrait lipidique (en mg.)	Cholestérol (en γ)
A (témoin)	9,0	31
B	7,2	24
C	7,5	»
D	6,9	20
E	8,9	20,5
F	15,0	37
G	16,3	56
H	15,5	47
I	16,3	56
J	16,5	37

L'examen de ces résultats montre que, si le salicylate possède la propriété de « décoller » une petite partie des lipides et du cholestérol sériques, cette partie est presque négligeable. Le maximum que nous ayons extrait (ampoule I) correspond à 56 γ, soit 11 mg. par litre, ce qui représente environ le centième du cholestérol total (Cheval).

Estimant que le facteur dilution, mis en jeu dans l'expérience précédente, pouvait apporter une perturbation dans l'extraction du cholestérol (Tayeau [62]), nous avons effectué une nouvelle série d'essais en évitant le plus possible la dilution du milieu.

Voici les mélanges que nous avons réalisés :

Ampoules	A	B	C	D	E	F	G
Sérum (cm³)	5	5	5	5	5	5	5
Solution de salicylate de sodium à 20 p. 100....	0	0,2	1,5	3	5	7	9
Ether	10	10	10	10	10	10	10

Voici les résultats que nous avons obtenus :

TABLEAU XI

Ampoules	Extrait lipidique (en mg.)	Cholestérol (en γ)
A (témoin)	20,8	54,8
B	18,8	94
C	10,0	50
D	10,9	54,5
E	14,4	77
F	52	260
G	70	354

Dans cette seconde expérience, la quantité maximum de cholestérol extrait se montre plus abondante, mais elle ne représente même pas le dixième du cholestérol total.

A la suite de ces deux séries d'essais, nous avons effectué de nombreuses expériences identiques qu'il ne nous est pas possible de rapporter ici. Qu'il nous suffise simplement de rappeler que le maximum de cholestérol extrait dans toutes ces expériences n'a jamais dépassé le dixième du cholestérol total.

Voici simplement, à titre documentaire, l'un de ces essais dans lesquels les quantités de salicylate mises en jeu étaient d'un ordre de grandeur comparable à ceux que l'on rencontre *in vivo*.

Voici les mélanges que nous avons effectués :

Ampoules	A	B	C	D	E	F	G	H
Sérum (cm^3)	5	5	5	5	5	5	5	5
Solution de salicylate de sodium à 2 p. 1.000...	0,125	0,250	0,500	0,750	»	»	»	»
Solution de salicylate de sodium à 1 p. 100....	»	»	»	»	0,125	0,250	0,500	0,750

Chaque mélange a été complété, s'il y a lieu, avec de l'eau physiologique jusqu'à 5,75 cm³, puis a été additionné de 10 cm³ d'éther.

Après cinq jours de contact, au cours desquels de nombreuses agitations ont été effectuées, nous avons recueilli les phases éthérées dans lesquelles nous avons dosé les lipides et le cholestérol.

TABLEAU XII

Ampoules	Extrait lipidique (en mg.)	Cholestérol (en γ)
Témoin	0,8	34
A	1,1	34
B	0,7	40
C	0,6	40
D	1,1	46
E	0,9	40
F	0,6	34
G	0,8	34
H	0,9	40

Il ressort de ces résultats que la quantité de lipides et de cholestérol extraits par l'éther en présence de salicylate de sodium reste négligeable.

Charonnat ayant signalé dans ses premières publications que l'addition de soude représentait souvent un facteur favorable dans l'extraction du cholestérol sérique par l'éther, nous avons effectué une dernière série d'essais en présence de soude.

Dans une première expérience, nous avons opéré avec des quantités croissantes de soude.

Voici les mélanges effectués :

Ampoules	Témoin	A	B	C	D	E	F
Sérum (cm³)	5	5	5	5	5	5	5
Solution de salicylate de sodium à 20 p. 100 (cm³)	5	5	5	5	5	5	5
Solution de lessive de soude d = 1,33 (gouttes)	0	II	V	X	XX	XXX	XL

Nos résultats se trouvent réunis dans le tableau XIII :

TABLEAU XIII

Ampoules	Extrait lipidique (en mg.)	Cholestérol (en γ)
Témoin	3,6	18
A	10	50
B	11,4	57
C	64	320
D	60	301
E	46	236
F	34	172

Ces résultats montrent effectivement que l'alcalinisation constitue un facteur favorable dans l'extraction du cholestérol sérique par l'éther en présence de salicylate, mais la quantité maximum extraite reste encore infime par rapport au cholestérol total.

Remarquons qu'il semble exister une concentration optimum en soude pour laquelle l'extraction du cholestérol est maximum. Cette constatation ne doit pas nous étonner; on sait, en effet, que l'alcali est un facteur de stabilisation des lipides en phase aqueuse (Thudicum [70]).

Dans une seconde expérience, nous avons opéré en présence de doses croissantes de soude et de salicylate.

Nous avons effectué les mélanges suivants :

Ampoules	Témoin	A	B	C	D
Sérum (cm³)	5	5	5	5	5
Solution de salicylate de sodium à 20 p. 100 (cm³)	0	0,2	0,5	1	2
Solution de lessive de soude d = 1,33 (gouttes)	II	II	IV	VI	VIII
Eau physiologique (cm³)	2	1,8	1,5	1	0
Ether (cm³)	10	10	10	10	10

Nos résultats se trouvent consignés dans le tableau XIV.

TABLEAU XIV

Ampoules	Extrait lipidique (en mg.)	Cholestérol (en γ)
Témoin	7,4	44
A	7,4	55
B	5,6	65
C	14,4	195
D	16,6	188

Ces résultats confirment donc entièrement les précédents.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE PREMIER

Nous avons montré, dans ce chapitre, que l'addition *in vitro* de salicylate de sodium au sérum sanguin n'accroît pas notablement le pouvoir extractif de l'éther vis-à-vis du cholestérol sérique. En milieu alcalin, l'extraction du cholestérol augmente légèrement, mais le poids du cholestérol ainsi extrait du sérum reste infime par rapport au poids du cholestérol total.

Nos conclusions se montrent en contradiction avec les expériences de Charonnat qui reconnaît au salicylate de sodium ajouté *in vitro* au sérum le pouvoir de favoriser l'extraction du cholestérol sérique par l'éther.

CHAPITRE II

Action du salicylate « in vivo » sur les cénapses lipido-protéidiques du sérum sanguin de l'Homme.

Nous avons vu, dans le chapitre précédent, que, contrairement aux assertions de CHARONNAT [9, 10], le salicylate ajouté *in vitro* au sérum ne permet pas une meilleure extraction du cholestérol sérique par l'éther.

Le phénomène allait-il se montrer identique *in vivo ?* Les exemples de comportement différent de substances variées *in vitro* et *in vivo* ne manquent pas : qu'il nous suffise de rappeler les expériences de TAYEAU [60, 61] sur les sels biliaires : cet auteur a montré que l'addition de cholate ou de taurocholate de sodium à du sérum ne permet pas à l'éther d'extraire le cholestérol sérique [60], tandis que ce même solvant extrait une grande partie et même parfois la totalité du cholestérol d'un sérum cholalémique [61].

Il en est de même pour le salicylate de sodium, et TAYEAU et NEUZIL [67] ont pu montrer, en 1946, au cours d'essais préliminaires, que si l'on agite un sérum provenant d'un sujet soumis à un traitement salicylé, avec de l'éther, ce solvant extrait une grande partie du cholestérol.

Nous avons étudié en détail cette propriété du salicylate *in vivo*, et les résultats que nous avons obtenus font l'objet du présent chapitre.

Premiers essais.

Dans une première série d'expériences, nous avons traité les sérums de divers malades ayant reçu, *per os* ou par injection, du salicylate de sodium. Chacun des échantillons de sérum étudié a été additionné d'un volume égal d'éther. Après un contact variant entre deux et cinq jours, au cours duquel le mélange a été fréquemment agité, nous avons analysé l'extrait éthéré et la phase sérique inférieure.

Le tableau XV consigne nos résultats (par litre).

TABLEAU XV

Malade traité au salicylate	Temps de contact entre le sérum et l'éther	Extrait éthéré		Phase sérique inférieure	
		cholestérol (g.)	phosphore	cholestérol (g.)	phosphore
N° 1	4 jours	0,80	0	0,58	++++
N° 2	5 jours	0,92	traces	0,10	++++
N° 3	5 jours	0,48	traces	»	»
N° 4	4 jours	0,66	0	0,60	+++
N° 5	4 jours	0,98	0	0,24	+++

Cette première série d'expériences montre nettement que le salicylate de sodium possède *in vivo* la propriété de favoriser l'extraction du cholestérol sérique par l'éther : ce solvant extrait, en effet, d'un sérum salicylé *in vivo* entre 50 et 90 p. 100 du cholestérol total.

Il ne s'agit pas d'une réaction instantanée, mais d'un phénomène à vitesse limitée, favorisée par l'éther. En effet, l'extraction demande quelques jours. Il est intéressant de signaler que les phosphatides résistent à l'extraction éthérée; seul le cholestérol se trouve « décollé ».

Nous avons effectué une seconde série d'expériences sur des malades que nous avons suivis, et dont les caractéristiques essentielles se trouvent réunies dans les tableaux XVI et suivants.

Observation I

(Service du Docteur E. Dubourg.)

Il s'agit d'un homme âgé de quarante-huit ans, entré dans le service pour des douleurs articulaires vagues, sans manifestations inflammatoires, et dont l'état général apparaît déficient; le malade paraît, en effet, très fatigué.

Avant d'entrer à l'hôpital, il a été déjà traité au salicylate de sodium. Le traitement est repris : 1° avec des doses voisines de 10 g. *per os* et, 2°, avec 1 g. par jour en injection intraveineuse. Le malade prend en même temps du bicarbonate de sodium. Nous lui avons fait deux prélèvements de sang (S_1 et S_2) à trois jours d'intervalle. Comme on pourra s'en rendre compte dans le tableau suivant, nous avons été frappé par l'abaissement considérable du taux des protéines sériques, et quand nous sommes retourné à l'hôpital pour signaler cette hypoprotéinémie et prendre de nouveaux échantillons de sérum, le malade était décédé brutalement.

TABLEAU XVI

	S_1 (g. par l.)	S_2 (g. par l.)
Protéines	38,6	37,4
Lipides totaux	4,03	3,8
Lipides directement extractibles à l'éther seul.	1,03	2,13
Lipides non extractibles à l'éther seul	3	1,7
Cholestérol total	0,48	0,93
Cholestérol directement extractible à l'éther seul	0,18	0,81
Cholestérol non extractible à l'éther seul	0,30	0,12
Phosphore extrait à l'éther seul	0,002	traces
Salicylémie	0,15	0,25
Cholestérol directement extractible à l'éther seul : $S_1 = 37$ p. 100 $S_2 = 87$ p. 100		

Observation II

(Service du Docteur E. Dubourg.)

Jeune fille entrée à l'hôpital pour manifestations rhumatismales, douleurs articulaires et température à 38°5. La malade présente quelques signes de légère atteinte cardiaque. Elle a déjà été traitée au salicylate de sodium avant son arrivée dans le service. On continue cette thérapeutique. Nous effectuons trois prélèvements chacun à deux jours d'intervalle (S_1, S_2, S_3). Au moment du prélèvement S_1, on lui donnait 8 g. de salicylate *per os* et 1 g. en injection intraveineuse. Au moment de S_2, 8 g. *per os* et 2 g. intraveineux. Enfin, lors du dernier prélèvement (S_3), 6 g. *per os* et 1 g. intraveineux, le tout accompagné de bicarbonate de sodium. Ces doses étaient valables pour la veille et le jour du prélèvement. L'évolution de la maladie étant favorable, la malade fut autorisée à quitter le service après une quinzaine de jours, il lui fut conseillé de suivre son traitement pendant quelques jours encore à la maison.

Le tableau suivant indique les résultats des différents dosages effectués sur ces trois sérums.

TABLEAU XVII

	S_1 (g. par l.)	S_2 (g. par l.)	S_3 (g. par l.)
Protéines	78	68,4	69,6
Lipides totaux	5,90	5,60	5,70
Lipides directement extractibles à l'éther seul	1	1,60	1,2
Lipides non extractibles à l'éther seul	4,8	4	4,5
Cholestérol total	1,47	2	1,84
Cholestérol directement extractible à l'éther seul	0,24	0,72	0,63
Cholestérol non extractible à l'éther seul	1,2	1,3	1,2
Phosphore total	0,08	0,06	0,08
Phosphore extractible à l'éther seul.	0,006	0,007	0,005
Phosphore non extractible à l'éther seul	0,07	0,05	0,007
Salicylémie	0,19	0,30	0,19

Cholestérol directement extractible à l'éther seul :

$S_1 = 16$ p. 100

$S_2 = 35$ p. 100

$S_3 = 34$ p. 100

Observation III

(Service du Professeur Creyx.)

Le malade, âgé de trente-six ans, entre dans le service pour pleurésie droite. Il passe quatre mois dans une maison de repos. Il revient à la suite d'un refroidissement; le malade est fatigué, sa température atteint 38° - 39°. Il ressent des douleurs dans les articulations des jambes et dans les articulations vertébrales.

Après un traitement à la pénicilline sans effet, et en raison de ses antécédents (rhumatisme articulaire aigu à l'âge de treize ans), on lui administre du salicylate de sodium avec du bicarbonate de sodium. Nous avons effectué trois prélèvements à trois jours d'intervalle. Les doses quotidiennes étaient de 6 g. *per os* et 1 g. en injection intraveineuse, le malade ne tolérant pas très bien le médicament; pour le deuxième prélèvement en S_2, le malade nous a avoué n'avoir pris que quatre à cinq comprimés de salicylate de sodium depuis la veille, ce qui explique la chute de la salicylémie; aussi, on lui administre, par la suite, 2 g. par la voie intraveineuse.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau XVIII.

TABLEAU XVIII

	S_1 (g. par l.)	S_2 (g. par l.)	S_3 (g. par l.)
Protéines	54	60,8	56,5
Lipides totaux	4,2	4,4	5
Lipides directement extractibles à l'éther seul	1,7	2	3
Lipides non extractibles à l'éther seul	2,4	2,3	2
Cholestérol total	1,4	1,1	0,95
Cholestérol directement extractible à l'éther seul	1,1	0,87	0,66
Cholestérol non extractible à l'éther seul	0,23	0,29	0,28
Phosphore total	0,06	0,04	0,04
Phosphore extractible à l'éther seul.	0,007	0,002	0,004
Phosphore non extractible à l'éther seul	0,05	0,03	0,03
Salicylémie	0,16	0,07	0,16

Cholestérol directement extractible à l'éther seul :

$S_1 = 83$ p. 100

$S_2 = 74$ p. 100

$S_3 = 66$ p. 100

Il ressort, des études cliniques et biochimiques précédemment exposées, que le salicylate possède *in vivo* la propriété de rendre le cholestérol sérique extractible par l'éther, tandis que les phosphatides résistent à cette extraction.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons insisté sur le fait qu'*in vitro* comme *in vivo*, le salicylate se fixe sur la fraction sérum - albumine. Il était donc intéressant de savoir si le cholestérol extrait par l'éther des sérums salicylés était également celui fixé aux albumines.

Pour résoudre ce problème, nous avons prélevé du sérum à un malade traité par le salicylate : nous avons séparé la fraction sérum - globuline par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, et nous l'avons redissoute à l'eau distillée. La solution de globulines ainsi obtenue et les eaux-mères de précipitation des globulines contenant les albumines ont été soumises chacune à la dialyse contre de l'eau physiologique ayant un titre en salicylate égal à celui du sérum initial. De cette façon, la dialyse élimine seulement le sulfate d'ammonium ; les fractions protéidiques ainsi préparées ont été traitées par l'éther comme précédemment, et l'extrait éthéré a été soumis à l'analyse.

Dans le tableau XIX se trouvent réunis nos résultats ainsi que quelques normes des sérums étudiés.

TABLEAU XIX

	Fraction globulines (g. par l.)	Fraction albumines (g. par l.)
Protéines	29,6	42,4
Lipides totaux	1,50	3,60
Lipides extractibles à l'éther seul	0,06	1,70
Lipides non extractibles à l'éther seul	1,43	1,90
Cholestérol total	0,40	1,03
Cholestérol extractible à l'éther seul	0,16	0,8
Cholestérol non extractible à l'éther seul	0,26	0,2
Cholestérol directement extractible à l'éther seul : Fractions globulines = 38 p. 100 Fractions albumines = 77 p. 100		

Nous avons répété d'autres fois cet essai à partir de sérum de malades, et nos résultats se sont trouvés confirmés. Il apparaît donc que le cholestérol extractible par l'éther des sérums salicylés *in vivo* correspond surtout au cholestérol de la fraction albumines, celle précisément sur laquelle se fixe le salicylate de sodium.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

Les différentes observations cliniques rapportées dans ce chapitre montrent que le salicylate de sodium possède la propriété *in vivo* de rendre moins stables les liaisons unissant le cholestérol aux protéines dans le sérum sanguin.

L'éther qui, d'un sérum normal, n'extrait que des traces de cholestérol, en enlève 30 à 90 p. 100 d'un sérum provenant d'un malade traité par le salicylate de sodium. Le cholestérol ainsi extrait par l'éther correspond surtout à celui fixé à la fraction sérum - albumine, sur laquelle précisément se trouve adsorbé le salicylate de sodium.

CHAPITRE III

Action du salicylate « in vivo » sur les cénapses lipido-protéidiques chez le Lapin.

Nous avons montré, dans le chapitre précédent, que l'éther possède la propriété d'extraire, des sérums salicylés *in vivo*, une grande partie du cholestérol lié à la fraction sérum - albumine.

Il nous a paru intéressant de savoir si cette constatation était susceptible d'être étendue à l'animal. A cet effet, nous avons effectué des expériences sur le Lapin.

Chez quatre lapins, nous avons pratiqué journellement, et pendant huit jours, une injection de salicylate de sodium.

Nous avons effectué à chaque animal un prélèvement de sang avant le traitement (A), un second prélèvement en fin de traitement (B), et un troisième prélèvement huit jours après la fin du traitement (C).

Nos résultats son consignés dans les tableaux suivants :

TABLEAU XX

	1er lapin (*) (g. par litre)			2e lapin (*) (g. par litre)		
	A	B	C	A	B	C
Lipides totaux	1,9	1,7	2,50	1,6	1,5	2,55
Lipides directement extractibles à l'éther seul.	0,45	0,97	0,40	0,27	0,50	0,30
Lipides non extractibles à l'éther seul	1,50	0,75	2,10	1,30	1	2,25
Cholestérol total	0,20	0,11	0,26	0,25	0,10	0,25
Cholestérol directement extractible à l'éther seul.	0,02	0,04	0,02	0,02	0,36	0,01
Cholestérol non extractible à l'éther seul	0,18	0,07	0,24	0,18	0,07	0,26
Salicylémie (par litre de sérum)	0	0,08	0	0	0,07	0

Cholestérol directement extractible à l'éther seul :

1er lapin			2e lapin		
A	B	C	A	B	C
13 p. 100	38 p. 100	9 p. 100	11 p. 100	32 p. 100	5 p. 100

(*) Les quantités de salicylate de sodium administrées aux premier et deuxième lapins ont été de 0,20 g. par jour pendant huit jours, en deux injections : une le matin et une le soir.

TABLEAU XXI

	3e lapin (*) (g. par litre)			4e lapin (*) (g. par litre)		
	A	B	C	A	B	C
Protéines	44	54,3	55,5	41,8	55,4	55,1
Lipides totaux	2,5	3,05	2,5	2,55	3,41	1,55
Lipides directement extractibles à l'éther seul.	0,40	0,62	0,50	0,10	0,72	0,34
Lipides non extractibles à l'éther seul	2	2,4	2,1	2,4	2,7	1,2
Cholestérol total	0,26	0,13	0,24	0,28	0,13	0,21
Cholestérol directement extractible à l'éther seul.	0,02	0,05	0,01	0,002	0,059	0,015
Cholestérol non extractible à l'éther seul	0,24	0,08	0,22	0,28	0,08	0,20
Salicylémie (par litre de sérum)	0	0,18	0	0	0,22	0

Cholestérol directement extractible à l'éther seul :

3e lapin			4e lapin		
A	B	C	A	B	C
8 p. 100	38 p. 100	4 p. 100	0,7 p. 100	42 p. 100	7 p. 100

(*) Les quantités de salicylate de sodium administrées aux deux lapins ont été respectivement de 0,60 g. par jour et pendant huit jours pour le troisième lapin, et de 1 g. par jour pour le quatrième lapin pendant le même laps de temps.

Les doses ont été réparties en deux injections : une le matin et une le soir.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Nous avons montré, dans ce chapitre, que les conclusions du chapitre II relatives à l'Homme se montrent susceptibles d'être étendues au Lapin.

Un lapin, auquel on injecte régulièrement du salicylate de sodium, présente des perturbations de son système lipido-protéidique sanguin : le sérum de cet animal livre en effet à l'éther une grande partie de son cholestérol sérique, alors que rien de semblable ne se produit avec le sérum d'un lapin non traité.

CHAPITRE IV

Considérations générales concernant l'action différente du salicylate de sodium sur le système lipido-protéidique du sérum « in vitro » et « in vivo ».

Nous avons montré précédemment la différence d'action du salicylate de sodium sur le sérum sanguin *in vitro* et *in vivo*.

1° L'addition de salicylate *in vitro* à du sérum sanguin ne permet pas à l'éther d'extraire de ce sérum une quantité appréciable de cholestérol.

2° Le sérum d'un homme ou d'un animal soumis au traitement par le salicylate de sodium livre à l'éther une grande partie de son cholestérol.

Comment expliquer cette différence d'action *in vitro* et *in vivo* ?

Nous nous permettons à ce sujet d'échafauder une hypothèse en nous basant, d'une part, sur les travaux de Machebœuf et Perrimond-Trouchet [43], d'autre part sur les travaux de Tayeau [63] relatifs aux acides biliaires.

Tayeau a montré la différence d'action des acides biliaires *in vitro* [60] et *in vivo* [61] sur les cénapses lipido-protéidiques du sérum sanguin :

a) Si l'on ajoute des sels biliaires (cholate, glycocholate, taurocholate de sodium) à du sérum sanguin, et que l'on

agite l'ensemble avec de l'éther, ce solvant n'extrait pratiquement pas de cholestérol, ni de phosphatides.

b) Si l'on agite le sérum provenant d'un malade cholalémique avec de l'éther, ce solvant extrait une abondante quantité et même parfois la presque totalité du cholestérol et des phosphatides.

Pour expliquer cette différence d'action des sels biliaires *in vitro* et *in vivo,* Tayeau se base sur les expériences réalisées par Machebœuf et Perrimond-Trouchet [43] et les siennes [61]. Machebœuf et Perrimond sont parvenus à réaliser la synthèse de cénapses lipido-protéidiques *in vitro :* pour cela, ils placent dans un dialyseur en collodion des savons (oléate de sodium), des sels biliaires (cholate de sodium) et des protéines. Ils portent l'ensemble à la dialyse contre de l'eau courante. Au début de l'opération, les acides gras des savons ne se trouvent pas fixés aux protéines, et il suffit d'acidifier légèrement le milieu (*p*H 6) pour que la presque totalité des acides gras (acide oléique) passe dans l'éther. Après plusieurs jours de dialyse, alors que les sels biliaires ont été éliminés, il n'en est plus de même : si, en effet, on acidifie le milieu (*p*H 6) et qu'on agite l'ensemble avec de l'éther, ce solvant n'extrait pratiquement plus d'acide gras, car il s'est formé des cénapses protéines-acide gras, ce dernier constituant restant stable en phase aqueuse même acide et inextractible par l'éther.

Machebœuf [42] pense qu'*in vivo* la synthèse des cénapses lipido-protéidiques s'effectue d'une façon comparable et « qu'un intermédiaire favorisant l'union est nécessaire pour que se réalisent des cénapses de type plus stable, et c'est peut-être grâce à un tel intermédiaire qu'elles se forment dans l'organisme ». Perrimond-Trouchet [51], dans sa thèse, précise même ce point de vue : « dans la veine porte, il existerait un mélange de lipides, de protéines et de sels biliaires, mais le foie, en éliminant ces derniers constituants, jouerait en quelque sorte le rôle de notre dialyseur. Dans le sang, qui normalement ne contient que des traces de sels

biliaires (1 mg. par litre), les lipides et les protéines se trouvent à l'état de cénapses lipido-protéidiques ».

Dans les ictères oblitérants, les sels biliaires ne pouvant plus s'éliminer par le cholédoque, il se produit ainsi, dans le foie, une hypertension biliaire et les constituants de la bile passent dans la circulation, où l'on peut d'ailleurs les mettre en évidence (*). Il en résulte que, dans la circulation, les protéines et les lipides se trouvent dans le même état que dans la veine porte (puisque les sels biliaires n'ont pas été éliminés) et, comme le signale Tayeau [63], les sels biliaires ont pris, sur la surface des protéines, la place dévolue aux lipides; ces derniers se trouvent de ce fait facilement extractibles par l'éther.

Il n'en est pas de même *in vitro,* et cela se comprend, car lorsque l'on ajoute des sels biliaires à un sérum normal, la surface des protéines se trouve déjà occupée par les lipides qui sont ainsi stabilisés.

On peut penser que les choses se passent d'une façon comparable avec le salicylate de sodium.

Lorsqu'un individu ou un animal se trouve soumis au traitement salicylé, ce sel se fixe sans doute sur les protéines et y reste, car on le retrouve dans le sang. Il prend ainsi la place d'une partie du cholestérol et ce dernier devient extractible par l'éther. Cette fixation, comme d'ailleurs la synthèse des cénapses, est très probablement d'origine hépatique, puisque l'action de l'éther s'exerce exclusivement sur la sérum - albumine; or, on connaît l'origine exclusivement hépatique de cette fraction protéidique.

On conçoit maintenant qu'*in vitro,* il n'en soit pas de même et que le salicylate ne puisse se substituer au cholestérol déjà fixé.

(*) Ces trois constituants ont été effectivement mis en évidence dans la veine porte (Josephson et Rydin).

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

Nous basant sur les travaux de Machebœuf et Perrimond-Trouchet, et sur les recherches de Tayeau, nous avons émis une hypothèse tendant à expliquer la différence d'action du salicylate de sodium sur le sérum sanguin *in vitro* et *in vivo*.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La détermination de la salicylémie chez les malades traités par le salicylate de sodium se montre susceptible de rendre de grands services aux thérapeutes.

Dans la première partie de notre travail, nous avons passé en revue les différentes méthodes proposées pour le dosage du salicylate dans le sang. Nous avons étudié les divers facteurs susceptibles d'influencer les dosages et nous avons montré les avantages présentés par la technique de BRODIE, UDENFRIED et COBURN.

Dans la seconde partie, nous avons étudié l'action exercée par le salicylate de sodium sur les constituants sériques. Les recherches que nous avons effectuées, à l'aide de techniques personnelles, permettent les conclusions suivantes :

1° *In vitro,* le salicylate de sodium se fixe essentiellement sur la fraction sérum - albumine du sang. Cette conclusion reste valable aussi bien pour l'Homme que pour l'animal.

2° Il en est de même *in vivo.* Les malades ou les animaux traités par le salicylate de sodium, soit par voie parentérale, soit *per os,* présentent dans leur sang des complexes sérum-albumine - salicylate; la quantité de salicylate fixée sur la fraction sérum-globuline se montre négligeable.

3° L'hémoglobine qui, vis-à-vis de certains sels comme le sulfate d'ammonium, se comporte comme la sérum - albumine, fixe le salicylate comme cette dernière protéine.

4° Les liaisons unissant le salicylate aux albumines

paraissent assez labiles et se montrent, en tout cas, différentes de celles unissant certains lipides ou les acides biliaires, par exemple, aux protéines : un sérum vieilli comme un sérum délipidé se conduit vis-à-vis du salicylate de sodium comme un sérum frais : on sait qu'il n'en est pas de même en ce qui concerne les acides biliaires ou certains lipides (Tayeau, Rolland, Blanquet).

5° *In vitro,* le salicylate de sodium ne présente qu'une action minime sur la décomposition des cénapses lipido-protéidiques; ce résultat se montre en désaccord avec les travaux de Charonnat, que nous discutons.

6° Nous avons confirmé les recherches de Tayeau et Neuzil concernant la décomposition *in vivo* par le salicylate de sodium des cénapses cholestéro-protéidiques chez l'Homme, et nous avons étendu les résultats de ces auteurs à l'animal, montrant ainsi la généralité du phénomène.

7° Il paraît exister un certain parallélisme entre le taux de la salicylémie et la quantité de cholestérol sérique directement extractible par l'éther.

8° Le cholestérol, directement extractible par l'éther des sérums salicylés *in vivo,* provient plutôt de la fraction sérum-albumine, celle qui précisément adsorbe le salicylate.

Nous avons enfin émis quelques considérations d'ordre biologique concernant le mécanisme d'action du salicylate de sodium *in vivo* sur les cénapses lipido-protéidiques.

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères, et s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins, je les instruirais et les soignerais sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu :
Le Doyen,
G. PORTMANN.

Vu, bon à imprimer :
Le Président,
F. TAYEAU.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 10 Juillet 1950.
Le Recteur.
E. DELAGE.

BIBLIOGRAPHIE

1. Anson. — *Journ. gén. Physiol.*, 1940, **23**, 327.
2. Benzinger et Kammerer. — *Ber. Chem. Ges.*, 1878, **11**, 557.
3. Bougault. — *Journ. Pharm. Chim.*, 1908, **28**, 145.
4. Bradley. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Méd.*, 1936, **35**, 1.
5. Brodie, Udenfried et Coburn. — *Journ. Pharm.*, 1944, **80**, 114.
6. Carnot et Coquoin. — *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 850.
7. Chabannier, Lebert et Lobo-Onell. — *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **88**, 178.
8. Chabannier, Lebert et Lobo-Onell. — *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **88**, 608.
9. Charonnat. — *Journ. Pharm. Chim.*, 1935, **22**, 574.
10. Charonnat. — *Journ. Pharm. Chim.*, 1936, **23**, 105.
11. Coburn. — *Johns Hopkins Hospital Bull.*, 1943, **73**, 435.
12. Coquoin. — *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, 1259.
13. Delage. — Thèse Sc., Paris, 1939.
14. Denigès. — *Bull. trav. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1911, **51**, 345.
15. Emery. — *Journ. Am. Pharm. Assoc.*, 1928, **27**, 18.
16. Faisky. — *Centr. Med. Wisensch.*, 1877, 238.
17. Feser et Friedberger. — *Klin. Wochschr.*, 1875, **12**, 321.
18. Fleischer. — *Deutsch. Arch. Klin. Med.*, 1876, **19**, 59.
19. François et Seguin. — *Bull. Soc. Chim.*, 1931, **49**, 1922.
20. Frédéric. — Thèse doct. Univ. (Pharm.), Nancy.
21. Friederichsen. — *Arch. Exp. Pathol. Pharm.*, 1917, **80**, 234.
22. Galimard. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 386.
23. Galimard. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1945, **27**, 206.
24. Galimard. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, **28**, 152
25. Galimard. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950, **32**, 143.
26. Gross et Greenberg. — The salicylates, a critical, bibliographic revent, 1 vol., Hillhouse-Press, édit., New-Haven (U. S. A.), 1948.
27. Hardy et Gardiner. — *Journ. Physiol.*, 1910, **40**, LXVIII.
28. Herissey. — *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **87**, 333.
29. Herrera-Ramos. — Thèse agrég. Méd., Montevideo, 1937.

30. Herrera-Ramos. — *Arch. Urug. Méd.*, 1938, **12**, 72.
31. Hewitt. — *Biochem. Journ.*, 1938, **32**, 26.
32. Hofmeister. — *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1889, **25**, 1.
33. Hoppe-Seyler. — *Handb. Phys. Chem.*, 1870, **3**, 196.
34. Jacoby. — *Biochem. Zeistchr.*, 1908, **9**, 238.
35. Jonnard. — Thèse, Sc., Paris, 1937.
36. Juin. — Thèse Méd., Bordeaux, 1947.
37. Lautemann. — *Ann. Chem.*, 1861, **120**, 309.
38. Lester, Lolli et Greenberg. — *Journ. Pharm.*, 1946, **87**, 329.
39. Mac Farlane. — *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 1209.
40. Machebœuf. — Thèse Sc., Paris, 1928.
41. Machebœuf. — L'état des lipides dans la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique. 1 vol., Paris, 1937, Hermann, édit.
42. Machebœuf. — *Exp. ann. Biochim. med.*, 1945, **5**, 71.
43. Machebœuf et Perrimond-Trouchet. — *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **132**, 585.
44. Machebœuf et Rebeyrotte. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 475.
45. Machebœuf et Tayeau. — *C. R. Ac. Sc.*, 1938, **260**, 860, et *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, **23**, 31.
46. Mendioroz. — *Rev. asoc. bioquim. argentina*, 1949, **16**, 17.
47. Messinger et Vortmann. — *Bers. Chem. Ges.*, 1889, **22**, 2313.
48. Messinger et Vortmann. — *Bers. Chem. Ges.*, 1890, **23**, 2755.
49. Pellegrini et Rabaglia. — *Boll. Soc. Ital. Biol. sper.*, 1948, **24**, 586.
50. Pérez. — Thèse Sc., Paris, 1939.
51. Perrimond-Trouchet. — Thèse Univ. (Pharm.), Bordeaux, 1949.
52. Porges et Spiro. — *Beitr. z. chem. Physiol. Pathol.*, 1903, **3**, 277.
53. Saltzmann. — *Journ. Biol. Chem.*, 1948, **174**, 399.
54. Sandor. — Thèse Sc., Paris, 1934.
55. Schlesser. — Thèse Méd., Paris, 1922.
56. Smith, Gleason, Stoll et Ogorzalek. — *Journ. Pharm.*, 1946, **87**, 237.
57. Taub et Taub. — *Journ. Am. Pharm. Assoc.*, 1922, **11**, 517.
58. Tayeau. — Thèse Sc., Bordeaux, 1939.
59. Tayeau. — *C. R. Ac. Sc.*, 1941, **212**, 575.
60. Tayeau. — *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 239.
61. Tayeau. — *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 240.
62. Tayeau. — Thèse Méd., Bordeaux, 1944.
63. Tayeau. — *Exp. Ann. Biochim. Méd.*, 1949, **10**, 251.
64. Tayeau et Blanquet. — Recent advances in Surface Chemistry, 1 vol., Butterworths Scient. Publ., London, 1948, p. 329.
65. Tayeau et Martin. — *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 923.
66. Tayeau et Florentin. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1945, **27**, 314.

67. Tayeau et Neuzil. — *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 79.
68. Tayeau et Rolland. — *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 511, et *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 108.
69. Tayeau et Rolland. — *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 394.
70. Tayeau et Rolland. — *Bull. trav. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1950, **88**, 11.
71. Thudicum (cité par Koch). — *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1903, **37**, 181.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 1

PREMIÈRE PARTIE

Principales méthodes de dosage du salicylate de sodium dans le sérum sanguin 5

CHAPITRE PREMIER. — MÉTHODES CHIMIQUES : TECHNIQUES PONDÉRALES 6

CHAPITRE II. — MÉTHODES CHIMIQUES : TECHNIQUES VOLUMÉTRIQUES 8

Technique de Messinger et Vortmann 8
Technique de A. Taub et H. Taub 9
Technique de Bradley 9

CHAPITRE III. — MÉTHODES CHIMIQUES : TECHNIQUES COLORIMÉTRIQUES 10

A. — Méthodes par extraction 10

Technique de Denigès 10
Technique de Frederichsen 11
Technique de Herissey 12
Technique de Galimard 12
Technique de Brodie, Udenfried et Coburn 13
Technique de Lester, Lolli et Greenberg 14

B. — Méthodes directes 14

Technique de Keller 15
Technique de Pellegrini et Rabaglia 15
Technique de Mendioroz 15

CHAPITRE IV. — MÉTHODES PHYSIQUES 16

Technique de Carnot et Coquoin 16
Technique de Saltzmann 16

Pages

Chapitre V. — Recherches personnelles. — Etude expérimentale de la réaction colorimétrique ion salicylique - sel ferrique 18

A. — Influence de la quantité de réactif ferrique mis en jeu sur l'intensité de la coloration 19

B. — Influence du temps de contact entre les divers réactifs 20

C. — Influence de la concentration en salicylate de sodium sur l'intensité de la coloration 22

D. — Influence jouée par le *p*H du milieu sur la réaction 24

Conclusions générales de la première partie 26

DEUXIÈME PARTIE

Etude de l'adsorption du salicylate de sodium sur les protéines du sérum sanguin 31

Chapitre premier. — Travaux antérieurs sur l'état du salicylate de sodium dans le sérum sanguin 32

Chapitre II. — Recherches sur le pouvoir adsorbant des protéines sériques vis-a-vis du salicylate de sodium « in vitro » 37

I. — Essais sur le sérum de Cheval 38

II. — Essais sur le sérum de Lapin 43

III. — Essais sur le sérum de Poule 44

IV. — Essais sur l'hémoglobine 45

V. — Etude quantitative du pouvoir adsorbant des protéines sériques vis-à-vis du salicylate de sodium *in vitro* 46

Conclusions du chapitre II 48

Chapitre III. — Recherches sur le pouvoir adsorbant des protéines vis-a-vis du salicylate de sodium « in vivo » 49

Conclusions du chapitre III 50

Chapitre IV. — Recherches sur la nature des liaisons protéines - salicylate dans le sérum salicylé 51

Conclusions du chapitre IV 54

TROISIÈME PARTIE

Pages

Action du salicylate de sodium sur les cénapses lipido-protéidiques « in vitro » et « in vivo » 55

Chapitre premier. — Action du salicylate « in vitro » sur les cénapses lipido-protéidiques du sérum 57

Conclusions du chapitre premier 62

Chapitre II. — Action du salicylate « in vivo » sur les cénapses lipido-protéidiques du sérum sanguin de l'Homme 63

Conclusions du chapitre II 69

Chapitre III. — Action du salicylate « in vivo » sur les cénapses lipido-protéidiques chez le Lapin 70

Conclusions du chapitre III 72

Chapitre IV. — Considérations générales concernant l'action différente du salicylate de sodium sur le système lipido-protéidique du sérum « in vitro » et « in vivo » 73

Conclusions du chapitre IV 76

Conclusions générales 77

Bibliographie 81

Bordeaux. — Imp. E. Drouillard, place de la Victoire, 3.